

Die Wirkung von Phosphodiesterase IV-Inhibitoren im Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Marcus Wendler
geboren am 28.07.1975 in Rodewisch

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Rolf Bräuer
2. Prof. Dr. med. Dr. phil. Jörg Kriegsmann
3. Prof. Dr. med. Gerd Hein

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.11.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Rheumatoide Arthritis	3
2.2. Bisherige Erkenntnisse über den Pathogeneseprozess der Rheumatoiden Arthritis	5
2.3. T-Zell-Subpopulationen und ihre Rolle in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis	7
2.3.1. Th1-Zellen	9
2.3.2. Th17-Zellen	9
2.3.3. Th2-Zellen	11
2.3.4. regulatorische T-Zellen	11
2.3.5. Th-Zell-Subpopulationen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis	13
2.4. Die Rolle der Makrophagen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis	14
2.5. Die Rolle der Synoviozyten in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis	15
2.6. Bisherige Therapiekonzepte für die Rheumatoide Arthritis	17
2.6.1. Etablierte Therapiekonzepte	17
2.6.2. Neue Entwicklungen	19
2.7. Experimentelle Modelle der Arthritis	20
2.8. Die Antigen-induzierte Arthritis	22
2.9. Second-Messenger-Systeme der Zelle und deren Regulationsmechanismen	23
2.10. Phosphodiesterasen als Regulatoren der Second-Messenger-Konzentration im Zytoplasma	24

2.11. Medikamentöse Beeinflussung der Aktivität der Phosphodiesterasen	25
2.12. Spezifische Phosphodiesterase IV-Inhibitoren als neue Therapieoption der Rheumatoiden Arthritis	27
3. Fragestellung und Ziele der Arbeit	30
4. Material und Methoden	32
4.1. Material	32
4.1.1. Versuchstiere	32
4.1.2. Geräte	32
4.1.3. Verbrauchsmaterialien	33
4.1.4. Chemikalien	34
4.1.5. Verwendete Kulturmedien, Lösungen und Puffer	35
4.1.6. Verwendete Antikörper	38
4.1.7. Verwendete Therapiesubstanzen	38
4.2. Methoden	38
4.2.1. Immunisierung und Arthritisinduktion	38
4.2.2. Beurteilung der Schwere der Arthritis	39
4.2.3. Messung der zellulären Immunreaktivität in vivo	41
4.2.4. Zellpräparationen und Zellkulturen	41
4.2.6. Zytokinbestimmung im ELISA	44
4.2.7. Zytokinbestimmung im Bioassay	45
4.2.8. NO-Test	47
4.2.9. Statistische Auswertung	47

5. Ergebnisse	49
5.1. Therapiestudien	49
5.1.1. Design und Beurteilung der Therapiestudien	49
5.1.2. Beeinflussung der Gelenkschwellung	51
5.1.3. Beeinflussung der T-Zell-Aktivität in vivo	53
5.1.4. Beeinflussung der Entzündung und Gelenkdestruktion	55
5.1.5. Zusammenfassung der klinischen Ergebnisse im Rahmen der Therapiestudien	59
5.2. Beeinflussung der Aktivität von Makrophagen, Lymphozyten und Synoviozyten in vitro durch den Phosphodiesterase IV-Inhibitor Rolipram	60
5.2.1. Beeinflussung der Aktivität von Makrophagen	60
5.2.2. Beeinflussung der Aktivität von Milzlymphozyten	66
5.2.3. Beeinflussung der Aktivität von Synoviozyten	70
6. Diskussion	74
6.1. Klinische Effekte von Phosphodiesterase IV-Inhibitoren auf die Antigen- induzierte Arthritis der Maus	76
6.2. Einfluss auf die histologische Entzündungsreaktion und Gelenkdestruktion	79
6.3. Einfluss auf das Zytokinmilieu im entzündeten Gelenk	80
6.3.1. Makrophagen	82
6.3.2. Synoviozyten	86
6.4. Einfluss einer intrazellulären cAMP-Erhöhung durch Phosphodiesterase- Inhibitoren auf T-Zellen	89
6.4.1. Beeinflussung der T-Zell-Proliferation	90
6.4.2. Einfluss auf die Th1/Th2-Balance	91

6.5. Weiterentwicklung des Therapieprinzips der Phosphodiesteraseinhibition	95
6.5.1. Mögliche Kombinationstherapien des Phosphodiesteraseinhibitors	
Rolipram	95
6.5.2. Mögliche Strategien zur Einschränkung der Nebenwirkungen von Phosphodiesterase-Inhibitoren	96
6.5.3. Derzeit in Entwicklung befindliche Phosphodiesterase-Inhibitoren	98
7. Schlussfolgerung	99
8. Literaturverzeichnis	101
9. Danksagung	115
10. Ehrenwörtliche Erklärung	116
11. Lebenslauf	117

Abkürzungsverzeichnis

AA	Adjuvans-Arthritis
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans (engl.: complete Freund's adjuvant)
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (engl.: collagen-induced arthritis)
ConA	Concanavalin A
cpm	counts per minute
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DTH	verzögerte Überempfindlichkeit (engl.: delayed-type hypersensitivity)
DZ	Dendritische Zelle
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fc	fragment cristallizable
FCS	Fetales Kaälberserum (engl.: fetal calf serum)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HLA	menschliches Leukozytenantigen (engl.: human leukocyte antigen)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.a.	intraartikulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
LK	Lymphknoten
mAb	monoklonaler Antikörper (engl.: monoclonal antibody)
mBSA	methyliertes bovines Serumalbumin
Mφ	Makrophage
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)

Abkürzungsverzeichnis

MNC	mononukleäre Zellen
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MS	Multiple Sklerose
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PDE	Phosphodiesterase
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
s.c.	subkutan
SCID	severe combined immunodeficiency
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl.: standard error of the mean)
SLE	systemischer Lupus erythematoses
T _c -Zelle	Zytotoxische T-Zelle (engl.: cytotoxic T-cell)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β (engl.: transforming growth factor- β)
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
Th1/Th2	T-Helfer-Zell-Subpopulation 1/2
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan

1. Zusammenfassung

In den letzten Jahren kamen verschiedene immunmodulatorische Wirkprinzipien in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis (RA) zur Anwendung. Es ist jedoch noch immer nicht gelungen, kausal und selektiv diejenigen immunologischen Vorgänge, die zur Ausprägung der Entzündungs- und Destruktionsvorgänge im rheumatischen Gelenk führen zu beeinflussen. Unselektive Phosphodiesterase-Inhibitoren sind bereits seit längerer Zeit bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen des Menschen im Einsatz. Selektive Inhibitoren der Phosphodiesterase IV (PDE IV) könnten aufgrund des spezifischen Vorkommens der PDE IV auf Zellen des Immunsystemes ein vielversprechender Ansatz für die Therapie der Rheumatoiden Arthritis sein, insbesondere da diese Substanzgruppe bereits in anderen Tiermodellen von Autoimmunerkrankungen mit Erfolg eingesetzt wurde.

Es soll daher in der vorliegenden Arbeit an der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) der Maus als Modell der humanen Rheumatoiden Arthritis die Wirkung einer Therapie mit selektiven PDE IV-Inhibitoren auf die Gelenkentzündung sowie die zugrundeliegenden Immunreaktionen untersucht werden.

In verschiedenen Therapiestudienansätzen konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit dem selektiven PDE IV-Inhibitor Rolipram in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase dieses Erkrankungsmodells eine signifikante Reduktion der klinischen Ausprägung der Arthritis bedingt, ein Effekt, der sich durch einen präventiven Therapieansatz 14 Tage vor Arthritisinduktion nochmals signifikant steigern lässt. Ein ähnlicher therapeutischer Effekt lässt sich für den selektiveren PDE IV-Inhibitor Piclamilast bereits ab einer Konzentration von 2,5mg/kg KG zeigen. Diese klinischen Ergebnisse werden durch eine histologisch nachweisbare signifikante Reduktion der Gelenkdestruktion unter Therapie untermauert. Ebenso signifikant reduziert durch eine Therapie mit selektiven PDE IV-Inhibitoren wird die T-Zellreaktivität in vivo, charakterisiert durch eine DTH-Reaktion. Eine zusätzliche Therapie mit dem depletierenden monoklonalen anti-CD4-Antikörper GK1.5 bewirkt einen additiven Effekt im Bereich der klinischen Wirkung.

Die der Rheumatoiden Arthritis zugrundeliegende Immunreaktion wird massgeblich durch die Aktivität von Makrophagen, T-Lymphozyten und den Synoviozyten der Gelenkinnenhaut bestimmt. Unter Therapie mit Rolipram kann eine deutliche Senkung der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 sowie eine gesteigerte Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch Makrophagen beobachtet werden.

Durch die Wirkung des selektiven PDE IV-Inhibitors kam es in vitro zu einer ausgeprägten Proliferationshemmung von T-Zellen. Diese Beobachtung wurde durch eine deutliche Hemmung von Interleukin 2 als Indikatorzytokin naiver T-Helfer-Lymphozyten bestätigt. Es zeigte sich eine Suppression der funktionellen Aktivität der Gesamtheit der T-Lymphozyten in Kultur sowie eine Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes hin zur Th2-Zell-Subpopulation.

Die Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6) und NO durch aktivierte synoviale Fibroblasten in vitro konnte durch selektive PDE IV-Inhibitoren effektiv gehemmt werden.

Insgesamt zeigen diese Untersuchungen, dass der Einsatz selektiver Inhibitoren der PDE IV zu einer signifikanten Reduktion der klinisch und histologisch nachweisbaren Entzündungsreaktion sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase der Antigen-induzierten Arthritis der Maus als Modell der Rheumatoiden Arthritis des Menschen führt. Dabei greifen Phosphodiesterase IV-Inhibitoren kausal im Pathogenesemechanismus der Rheumatoiden Arthritis an. Der Einsatz der Phosphodiesterase-Inhibitoren wirkt proliferationshemmend und immunmodulierend auf T-Lymphozyten und bedingt eine Verschiebung hin zur Th2-Reaktion. Es tritt eine Inhibition der Aktivierung von Makrophagen und Synoviozyten im Rahmen der Entzündungsreaktion ein.

Der therapeutische Einsatz von Phosphodiesterase IV-Inhibitoren in der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis des Menschen erscheint daher zum jetzigen Zeitpunkt erfolgversprechend. Dabei ist ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sowohl eine therapeutische Medikation in der akuten Entzündungsphase als auch eine Intervallmedikation zur Verzögerung bzw. Reduktion der Schwere einer erneuten Exazerbation denkbar. Eine Kombinationstherapie mit anderen Wirkmechanismen wie beispielsweise dem Einsatz nichtdepletierender monoklonaler anti-CD4-Antikörper könnte zu einem additiven Effekt in der klinischen antiinflammatorischen Wirkung führen. Aufgrund der gezeigten proliferationshemmenden und immunmodulatorischen Wirkung von selektiven PDE IV-Inhibitoren auf T-Lymphozyten wäre auch ein Einsatz dieser Stoffklasse bei einer Reihe weiterer, T-Zell-vermittelter Autoimmunerkrankungen vorstellbar.

2. Einleitung

2.1. Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, die durch einen destruierenden Entzündungsprozess an verschiedenen Gelenken, begleitet von einer unterschiedlich stark ausgeprägten mesenchymalen Entzündungsreaktion anderer Organsysteme gekennzeichnet ist. Die Folge ist eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Patienten, insbesondere durch starke Schmerzen und eine abnehmende Mobilität, in vielen Fällen auch eine krankheitsbedingte Verkürzung der Lebenserwartung.

Die Rheumatoide Arthritis wird zu den primär-chronischen Erkrankungen gezählt, die durch eine sich selbst unterhaltende Entzündungsreaktion gekennzeichnet sind. Diese „self perpetuation“ bedeutet, dass ein einmal in Gang gesetzter Krankheitsprozess Mechanismen wirksam werden lässt, die den Fortbestand der Entzündung unterhalten. Charakteristisch für solche Erkrankungen ist, dass aktivierte T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen als Träger der immunpathologischen Reaktion fungieren. Historisch wurde die Rheumatoide Arthritis zusammen mit dem Lupus erythematoses und der Periarteriitis nodosa, mit denen sie das histologische Bild der fibrinoiden Kollagennekrose gemein hat, unter dem Oberbegriff der Kollagenkrankheiten zusammengefasst (Hamperl, 1954; P, 1950). Lange Zeit wurde die Rheumatoide Arthritis ätiologisch auch mit dem streptokokkeninduzierten Rheumatismus gleichgesetzt (Hamperl, 1954). Heute definiert man sie als eigene Krankheitsentität mit chronisch-entzündlichem Charakter und immunpathologischer Genese.

Durch eine Entzündung der Gelenkinnenhaut (Synovialis) kommt es zu Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis. Im extraartikulären Bindegewebe beobachtet man daneben ebenfalls entzündliche Prozesse, die Muskulatur, Sehnen, Bänder, Lunge, Herz und Auge befallen können.

Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer schubweisen Progredienz der destruierenden Gelenkentzündung, die letztlich zu massiven Funktionseinschränkungen, bei schweren Verlaufsformen in wenigen Jahren bis hin zur Invalidität führt (Wollenhaupt and Zeidler, 1993). Das Auftreten von interstitiellen Lungenerkrankungen, Pleura- und Perikardergüssen sowie Vaskulitiden führt zu einer Erhöhung der Mortalität.

Frauen sind häufiger von der Erkrankung betroffen als Männer, insgesamt liegt die Inzidenz in den westlichen Industrienationen bei 50 von 100000, der Gipfel der Erkrankungshäufigkeit

um das 4. Lebensjahrzehnt (Schettler and Greten, 1997).

Die Diagnose der RA wird klinisch anhand der Kriterien des American College of Rheumatology gestellt, die eine Arthritis an drei oder mehr Gelenkgruppen, einen Befall der Hand- und Fingergelenke, ein symmetrisches Befallsmuster, den Nachweis von Rheumafaktoren im Serum sowie typische Röntgenveränderungen umfassen. Zur prognostischen Einschätzung der Progredienz der Destruktionen kann unter anderem eine genetische Analyse der HLA-Subtypen herangezogen werden, wobei als ungünstige Prognose das Vorhandensein von HLA-DR1 und HLA-DR4 gilt (Hein et al., 1995).

Histologisch ist die Rheumatoide Arthritis zunächst durch die Infiltration neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Zellen in die Synovialis sowie eine reaktive Proliferation der synovialen Deckzellen gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf der Erkrankung ändert sich der Charakter der entzündlichen Infiltration in der Gelenkinnenhaut, es stehen dann Lymphozyten und Plasmazellen im Vordergrund. Daneben finden sich rheumatische Granulome, die aus Histiozyten und Epitheloidzellen bestehen. Die proliferativen Vorgänge im Bereich der Synovialis führen zur Ausbildung eines Pannusgewebes, das zwischen die Gelenkflächen vorwächst und zur Destruktion des hyalinen Knorpels führt. Hierdurch kann es im Ergebnis eines jahrelangen, schubweisen Entzündungsverlaufes zur vollständigen Destruktion von Synovialis, Gelenkknorpel und Gelenkinnenflächen und letztlich zur knöchernen Versteifung (Ankylose) der Gelenke kommen.

In extraartikulären Geweben finden sich ähnliche rheumatische Granulome wie im Bereich des Bewegungsapparates, die mit einer entzündlichen Destruktion, Fibrosierung und Funktionseinschränkung der betroffenen Organe einhergehen. Daneben findet man Sekundärveränderungen einer chronischen Entzündung wie die Ablagerung von Amyloid (Amyloidose) (Eder and Gedigk, 1990).

Die Ätiologie der RA ist bisher noch nicht abschliessend geklärt. Grundsätzlich wird jedoch ätiologisch eine Autoimmunerkrankung favorisiert. Hierfür spricht das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen Immunglobuline (Rheumafaktoren), Antinukleäre Faktoren sowie Antikörper gegen Typ-II-Kollagen, Bestandteile des Cytoskeletts und Vimentin, aber auch nicht zuletzt die therapeutische Wirksamkeit immunsuppressiver Massnahmen (Hein et al., 1995). Das verstärkte Vorhandensein von Th1-Zellen im Synovium und eine massive Knorpeldestruktion legt eine autoimmunologische Reaktion gegen Knorpelstrukturen nahe, ein spezifisches Autoantigen konnte jedoch bis heute nicht nachgewiesen werden.

Ein genetischer Zusammenhang erscheint sehr wahrscheinlich, denn es besteht eine

Assoziation der RA mit HLA-DR4 und HLA-DR1, eine Assoziation mit dem Vorhandensein einer bestimmten Aminosäuresequenz im Bereich der β -Kette des MHC-Klasse-II-Moleküls ist bewiesen worden (Harris, 1990).

Weiterhin wird auch eine mögliche virale Genese der Erkrankung diskutiert. Diese Hypothese gründet auf dem Nachweis antiretroviraler Antikörper im Serum von Patienten mit RA (Starkebaum et al., 1996). Ausserdem konnte in Experimenten mit der MRL-lpr/lpr-Maus ein spontanes Auftreten einer destruierenden Arthritis mit initialer Proliferation phänotypisch veränderter Synovialzellen und Invasion in Knorpel und Knochen beobachtet werden, die zunächst ohne Entzündungsreaktion abläuft. Erst nach der initialen Erkrankungsphase kommt es in diesem Modell zur Infiltration mit Entzündungszellen. Möglicherweise könnte es sich also auch um eine retrovirale Transformation von Synovialzellen handeln (Gay and Gay, 1989; Gay et al., 1993). Experimentell liessen sich zudem Sequenzhomologien zwischen HLA-DR-1 und HLA-DR-4, die mit der RA assoziiert sind, und einigen viralen Antigenen (zum Beispiel Glykoprotein 110 des Epstein-Barr-Virus) feststellen, so dass auch ein molekulares „Mimikry“, das Kreuzreaktionen zwischen exogenen und endogenen Antigenen begünstigt, als möglicher pathogenetischer Mechanismus der RA fungieren könnte. Durch einen ähnlichen Mechanismus könnten neben Viren wie Parvovirus B19, EBV oder bisher noch nicht klassifizierten Retroviren auch humane „Hitzeschock“-Proteine oder bakterielle Proteine in ursächlichem Zusammenhang mit der Auslösung der RA stehen (Inman, 1991; Moreland and Koopman, 1991; Taylor et al., 1992; Tsuchiya and Williams, 1992; Wilder and Crofford, 1991).

Eine mykobakterielle Infektion wird aufgrund von immungenetischen und pathologischen Gemeinsamkeiten sowie einer ähnlichen pathologischen IgG-Glykosylierung der RA mit langsamen bakteriellen Infektionen ebenfalls in Betracht gezogen (McCulloch et al., 1993).

2.2. Bisherige Erkenntnisse über den Pathogeneseprozess der Rheumatoiden Arthritis

Kennzeichnend für die Pathogenese der RA ist die Trias von Entzündung, synovialer Hyperplasie und anormaler Immunreaktion (Gay and Gay, 1989). Für die RA typische Immunphänomene stellen das Auftreten sogenannter Rheumafaktoren, die Akkumulation von spezifischen T-Lymphozyten im entzündeten Gelenk, eine systemische Aktivierung von Makrophagen und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine dar.

Als Rheumafaktoren werden Autoantikörper verschiedener Immunglobulinklassen gegen den Fc-Teil von IgG-Molekülen bezeichnet. Das Auftreten dieser Antikörper ist bei der Rheumatoiden Arthritis sehr häufig, aber nicht spezifisch: man findet sie ebenfalls bei

Vaskulitiden, Kollagenosen und verschiedenen chronischen Entzündungen.

An der Entwicklung der für die RA typischen destruierenden Entzündung sind massgeblich vor allem T-Lymphozyten (CD3-positiv), Makrophagen und die Zellen der Synovialmembran beteiligt.

In den lichtmikroskopisch follikelähnlich erscheinenden lymphoiden Aggregaten lassen sich vor allem Zellen des T-Helfer-Phänotyps (CD4-positiv) nachweisen, die durch Expression von Aktivierungsmarkern der VLA-Familie als aktiviert einzuordnen sind (Hein et al., 1995). Die T-Zellen machen 80% der Lymphozyten im Infiltrat aus. Davon sind 40% als Th1-Typ einzuordnen (Kinne et al., 1997). Das exprimierte Zytokinmuster zeigt ein Überwiegen der Th1-Zytokine (Simon et al., 1994), was als Hinweis auf eine Autoimmunpathogenese der Erkrankung zu sehen ist.

Diese Zellen exprimieren das CDw29 und CD45RO-Antigen, überwiegend jedoch keinen IL-2-Rezeptor. Es handelt sich also phänotypisch in der Mehrzahl um Memory-Zellen. Nur etwa 10% der T-Lymphozyten sind durch den CD25-Rezeptor als T-Helfer-Inducer-Zellen gekennzeichnet. Die transendotheliale Migration der Zellen von den postkapillären Venolen in das entzündliche Gewebe wird reguliert durch verschiedene vaskuläre Adhäsionsmoleküle, deren Expression v.a. durch das Vorhandensein von Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin 1 (IL-1) und Tumor-Nekrosis-Faktor- α (TNF- α) gesteuert wird, und verläuft entlang eines Gradienten chemotaktischer Faktoren (Hein et al., 1995).

Durch eine Interaktion der akkumulierten aktivierten T-Lymphozyten mit den ortsständigen Synoviozyten kommt es im weiteren Verlauf zur Aktivierung der Synovialzellen, was zu einer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen führt. Lichtmikroskopisch beobachtet man eine Verdickung der Synovialmembran. Hierbei spielt die Proliferation fibroblastenähnlicher TypB-Synoviozyten eine Rolle, jedoch auch die Einwanderung von makrophagenähnlichen TypA-Synoviozyten. Im weiteren Krankheitsverlauf dominieren Makrophagen und Monokine, insbesondere TNF- α und IL-1 β . Es konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen der Erkrankung zu einer systemischen Aktivierung dieser Zellen kommt, die dadurch u.a. zur vermehrten Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α angeregt werden (Burmester et al., 1997). Diese Botenstoffe können im Entzündungsgeschehen vielfältige Wirkungen entfalten, die sich im Rahmen eines komplizierten Systems von pro- und antiinflammatorischen Wirkungen vielfach überschneiden und aufheben. Trotzdem können die Zytokine IL-1 β und TNF- α als die wichtigsten entzündungsauslösenden und entzündungsunterhaltenden Faktoren angesehen werden. Sie werden hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen, in weit geringerem Maße jedoch auch von den aktivierten Synoviozyten sezerniert. Beide Interleukine besitzen eine

matrixabbauende und kollagensynthesehemmende Wirkung und fördern die Osteoklastentätigkeit.

2.3. T-Zell-Subpopulationen und ihre Rolle in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Die T-Zell-Abhängigkeit der Antigen-induzierten Arthritis der Maus konnte in der Nude-Maus (Brackertz et al., 1977a) sowie durch den Transfer der Arthritis durch Lymphozyten arthritischer Tiere nachgewiesen werden. Durch Vorbehandlung der Transferzellen mit Antiserum gegen den murinen T-Zell-Marker Thy-1 (Cdw90) konnte eine Reduktion der Krankheitsaktivität erreicht werden. Dahingegen verstärkte eine Anreicherung der T-Zellen durch Abtrennung der B-Lymphozyten das Krankheitsbild nach dem Transfer (Brackertz et al., 1977b). Im adoptiven Transfer konnten Petrow et al. (1996) zeigen, dass die Suszeptibilität von Th-Zellen bestimmt wird.

Die Rolle der CD8+ T-Zellen (Tc-Zellen) für die Entstehung und den Verlauf der Arthritis ist noch nicht geklärt. Es gibt jedoch Hinweise für eine Tc-vermittelte Downregulation der Immunreaktion (Petrow et al., 1996; Wutzler, 1998). Ähnliche Ergebnisse zeigen eine Regulation der Inzidenz der Arthritis sowie eine Verhinderung einer Reinduktion nach abgeklungener chronischer Entzündung im Modell der Kollageninduzierten Arthritis (CIA) (Tada et al., 1996).

T-Zellen können entsprechend ihrer unterschiedlichen Wirkungen in vivo und in vitro in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden (Del Prete et al., 1995; Mosmann et al., 1986). Man kennt proinflammatorische T-Zellen, zu denen Th1-Zellen, die die zelluläre Immunität fördern, sowie Th17-Zellen gehören. Th2-Zellen fördern die humorale Immunität und besitzen suppressive Funktionen. Daneben existieren eine Reihe von regulatorischen T-Zellen, die starken supprimierenden Einfluss auf Immunreaktionen ausüben können. Hierzu zählen Th3, Tr1-Zellen sowie die CD4+CD25+ sogenannten natürlichen regulatorischen Zellen (nTreg) (van Roon et al., 2006). Diese unterschiedliche Funktionalität wird unter anderem durch ein spezielles Zytokinmuster der einzelnen Subpopulationen vermittelt (siehe Tabelle 1).

Die verschiedenen Subpopulationen der Th-Zellen entstehen aus naiven Th-Vorläuferzellen (Sad and Mosmann, 1994). Verschiedene endogene und exogene Faktoren beeinflussen die Differenzierung zu den verschiedenen T-Zell-Subpopulationen. Die Differenzierung zu Th1-Zellen wird durch die Interleukine IL-12, IL-15, IL-18 und IFN- γ aus aktivierten Makrophagen stimuliert, während IL-4 die Entwicklung von Th2-Zellen unterstützt. Durch

diese gezielte Polarisierung der Th-Vorläuferzellen zu Th1 oder Th2-Zellen kann eine Modulation der Th1/Th2-Balance

Tabelle 1: Zytokinprofil der T-Helferzellsubpopulationen (Frey et al., 2005; Langrish et al., 2005; Lubberts et al., 2005; Simon, 2000; van Roon et al., 2006)

Zytokine	Th1	Th17	Th2	Th3	Tr1	nTreg
IFN- γ	+++		-			
TNF- β	+++		-			
IL-2	+++		+		+	
TNF- α	+++	+	+			
GM-CSF	++		++			
IL-3	++		+++			
IL-10	+		++		+++	+
IL-13	++		+++			
IL-4	-		+++			
IL-5	-		+++			
IL-6		+				
IL-17		+++				
TGF- β	-		-	+++		+

im Körper erfolgen und somit eine zelluläre (Th1) oder humorale (Th2) Immunantwort induziert werden. Es konnte für das Modell der Leishmaniasis gezeigt werden, dass die Induktion der zellulären Th1-Antwort eine erfolgreiche Auseinandersetzung des Immunsystemes mit dem Erreger zur Folge hat, während eine humorale Th2-Antwort zum tödlichen Ausgang der Infektionserkrankung führt (Menon and Bretscher, 1998; Sommer et al., 1998).

Für die Regulation der gezielten Differenzierung kommen in vivo neben den o.g. Zytokinen eine Vielzahl anderer Mechanismen in Frage. Zum einen besteht eine Regulation der Zytokine untereinander, zum anderen ist die Polarisierung häufig auch von der Konzentration der Interleukine abhängig. So konnten in vitro durch IL-4, ein Th2-Zytokin, in Abhängigkeit von dessen Serumkonzentration sowohl Th2- als auch Th1-Zellen polarisiert werden (Lingnau et al., 1998). Die differenzierten T-Zell-Subpopulationen können also durch ihre Zytokinsekretion eine Polarisierung weiterer naiver Th-Vorläuferzellen beeinflussen.

Nach Abschluss der Differenzierung der Th-Zellen ist keine Beeinflussung der Zelle durch exogene Faktoren mehr möglich (Isomaki et al., 1999; Mocci and Coffman, 1997).

Eine Unterscheidung der Th-Subpopulationen ist durch den Nachweis ihrer spezifischen Zytokinsekretion möglich. Außerdem ist bekannt, dass der Isotypwechsel zu IgG2a und IgG2b durch Th1-Zytokine, der Wechsel zu IgG1 und IgE durch Th2-Zytokine induziert wird

(Finkelman et al., 1990). Th1-Zellen fördern die Sekretion von proinflammatorisch wirksamem IL-1 β , während Th2-Zellen die Produktion von IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) induzieren (Chizzolini et al., 1997).

2.3.1. Th1-Zellen

Th1-Zellen sezernieren vor allem IL-2, IFN- γ und TNF- β . Durch dieses Zytokinmuster induzieren sie eine zelluläre Immunantwort: IFN- γ und TNF- β inhibieren die B-Zellreaktion und damit die humorale Immunität. IFN- γ aktiviert Monozyten und Makrophagen, die durch eine erhöhte Expression von Fc-Rezeptoren verstärkt Immunglobuline binden können und ihrerseits IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 und TNF- α sezernieren. Insbesondere durch IL-1 β , IL-15 und IL-18 wird wiederum die Differenzierung der naiven Th-Voläuerzellen zu Th1-Zellen gefördert. B-Zellen werden durch Th1-Zellen zur Produktion von Immunglobulinen der Subklassen IgG2a und IgG2b, opsonierenden und komplementbindenden zytotoxischen Antikörpern angeregt.

Insgesamt resultiert daraus eine Induktion der zellulären Immunität, d.h. der Immunabwehr v.a. intrazellulärer Erreger wie Viren, intrazellulären Bakterien oder Protozoen. Auf demselben Mechanismus basiert die Induktion der Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ (DTH1-Reaktion). Die Th1-Zellen werden jedoch auch für die Entwicklung von Autoimmunphänomenen, wie im Falle der RA, verantwortlich gemacht.

Die Aktivierung der Th1-Zellen erfolgt durch die Erkennung eines Antigen-MHCII-Komplexes, der von professionellen Antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen getragen wird. Für eine effektive Aktivierung der T-Effektorzellen sind jedoch kostimulatorische Signale notwendig. Diese können durch Oberflächenmoleküle oder durch Zytokine vermittelt werden. Antigenpräsentierende Zellen werden durch die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) zur Ausprägung dieser kostimulatorischen Merkmale veranlasst. Im Falle einer Infektionsabwehr durch das Immunsystem können bestimmte molekulare Muster der Mikroorganismen wie Lipopolysaccharide oder Endotoxine an TLR binden (van Roon et al., 2006).

2.3.2. Th17-Zellen

Wie auch Th1-Zellen gehören die erst seit kurzem bekannten Th17-Zellen zum Pool der CD25-negativen T-Zellen. Sie kommen in großen Mengen im arthritischen Gelenk vor

(Chabaud et al., 1999). Th17-Zellen produzieren vorrangig IL-17, aber auch IL-6 und TNF (Langrish et al., 2005).

Interleukin 17 (IL-17A) aus Th17-Zellen gehört zur IL-17-Familie, die aus fünf Interleukinen besteht, die mit IL-17A bis F bezeichnet werden. Die Hauptproduzenten des IL-17 im arthritischen Gelenk sind Th17-Zellen, aber auch aktivierte Monozyten können IL-17 produzieren. IL-17 bindet an den ubiquitären IL-17 Rezeptor (IL-17R) und aktiviert über Adapterproteine einen transkriptionellen Pathway, den auch IL-1 und TNF- α nutzen: daran sind NF-kappaB und alle drei Klassen mitogenaktivierter Proteinkinasen (MAP-Kinasen) beteiligt. Über diese Mechanismen wird die IL-17-Signalwirkung in Synoviozyten und Chondrozyten vermittelt (Lubberts et al., 2005). IL-17 kann die Produktion von IL-6 und IL-8 in Fibroblasten stimulieren und die T-Zell-Proliferation anregen. Außerdem steigert es die Produktion an Granulozyten/Makrophagen-stimulierendem Faktor und Prostaglandin E2 in Synoviozyten (Fossiez et al., 1996; Lubberts et al., 2005). In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass IL-17 darüberhinaus in der Lage ist, Monozyten zur Sekretion von IL-1 und TNF- α zu stimulieren (Jovanovic et al., 1998). Im rheumatoiden Gelenk kann IL-17 den Chondrozytenmetabolismus inhibieren, den Proteoglycanabbau steigern und Metalloproteinasen induzieren. Außerdem stellt es einen potenten Stimulator der Osteoklastogenese dar (Lubberts et al., 2005). In Kombination mit TNF- α kommt es unter dem Einfluss von IL-17 zu einer gesteigerten Resorption durch Osteoklasten in vitro (Van bezooijen et al., 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass diese T-Zell-Subpopulation durch das Zytokin IL-23 induziert werden kann. Die Behandlung von Mäusen mit einem Antikörper gegen IL-23 konnte die Auslösung der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) als Modell der multiplen Sklerose verhindern (Chen et al., 2006). IL-23 defiziente Mäuse können verschiedene Modelle von Autoimmunität, wie die Kollagenarthritis, inflammatorische Darmerkrankungen oder die EAE nicht ausprägen (Steinman, 2007). In adoptiven Transfer-Experimenten konnte für Th17-Zellen gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, Autoimmunerkrankungen wie die EAE in gesunden Tieren zu induzieren (Langrish et al., 2005). In IL-17-defizienten Mäusen war die Auslösung einer Kollageninduzierten Arthritis nicht möglich (Nakae et al., 2003).

Diese Befunde legen eine Schlüsselrolle der Th17-Zellen und des von ihnen produzierten IL-17 in der Pathogenese von entzündlichen Autoimmunerkrankungen nahe.

2.3.3. Th2-Zellen

Th2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. IL-4 fördert die Produktion von Immunglobulinen, insbesondere der Isotypen IgG1 und IgE durch B-Zellen. IL-5 aktiviert Mastzellen und führt zu einer verstärkten Sekretion von IgA, das für die Abwehrfunktion der Schleimhäute eine besondere Bedeutung hat. IL-5 fördert außerdem die Proliferation von Eosinophilen. Th2-Zellen begünstigen somit die humorale Immunantwort, sind aber durch die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13 auch für eine überschüssige Proliferation und Aktivierung von Eosinophilen und Mastzellen im Rahmen allergischer Erkrankungen verantwortlich. Th2-Zellen führen zur Entstehung der sogenannten DTH2-Reaktion (Muller et al., 1994).

2.3.4. regulatorische T-Zellen

Die Aktivierung der Effektor-T-Zellen durch den Antigen-MHCII-Komplex und kostimulatorische Signale ist im Falle einer Immunreaktion gegen Infekte oder Fremdantigene im Verlauf der Immunreaktion selbstlimitiert durch das Wegfallen der pathogenen molekularen Muster, die durch TLR erkannt werden und eine effektive Aktivierung der T-Zellen durch kostimulatorische Signale bedingen. Wenn jedoch T-Zellen Selbstantigene in Verbindung mit einem adäquaten kostimulatorischen Signal erkennen, tritt eine Aktivierung ein, deren Stimulus nicht selbstlimitiert ist. Dies führt zu einer persistierenden Aktivierung der Effektor-T-Zellen und somit zu einer chronischen Entzündungsreaktion. Um eine solche unerwünschte Immunreaktion zu verhindern, umfasst das Immunsystem eine Reihe von immunsuppressiven regulatorischen Zellen. Diese kontrollieren die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen und vermitteln somit eine immunologische Selbsttoleranz (Frey et al., 2005).

Man kennt zwei Gruppen von regulatorischen T-Zellen. Dies sind zum einen adaptive regulatorische T-Zellen, die durch antigenspezifische Stimulation konventioneller T-Zellen unter tolerogenen Bedingungen entstehen sowie zum anderen sogenannte natürliche regulatorische T-Zellen.

Adaptive regulatorische T-Zellen unterscheiden sich durch ihr spezifisches Zytokinspektrum. Tr1-Zellen produzieren IL-10 und wenig TGF- β . Sie sind durch eine niedrige Proliferationskapazität gekennzeichnet. Tr1-Zellen sind in der Lage, sowohl Th1- als auch

Th2- vermittelte Immunreaktionen zu hemmen. Diese Suppression ist zum größten Teil IL-10 vermittelt. In der Zellkultur kann man Tr1-Zellen durch wiederholte Stimulation mit IL-10 oder durch unreife dendritische Zellen induzieren (Lan et al., 2005; van Roon et al., 2006).

Th3-Zellen produzieren in großer Menge TGF- β . Th3-Zellen können in vitro durch Mitogenstimulation in Anwesenheit von IL-2 und TGF- β induziert werden. In vivo wurden sie bei Patienten mit Multipler Sklerose nach oraler Verabreichung von Myelinproteinen gefunden.

Die immunsupprimierende Funktion von Tr1 bzw. Th3-Zellen wird über Zytokine vermittelt, eine Blockade von IL-10 und TGF- β kann die regulatorische Funktion dieser Zellen aufheben (van Roon et al., 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass bei RA-Patienten Tr1- und Th3-Zellen im entzündeten Synovialgewebe vorkommen, jedoch in niedrigerer Zahl als bei Patienten mit einer reaktiven Arthritis (Appel et al., 2004).

Sogenannte natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) sind gekennzeichnet durch die konstitutionelle Expression von CD25. Außerdem exprimieren sie selektiv den Transkriptionsfaktor FoxP3 (Cao et al., 2006). Es ist bekannt, dass ein Fehlen dieser Zellen in vivo zur Ausprägung eines schweren Autoimmunsyndromes führt, dass verschiedene Organsysteme betrifft. Im Maussystem lässt sich ein solches Polyautoimmunsyndrom durch adoptiven Transfer von nTregs verhindern. CD4+CD25+ Zellen verlassen den Thymus als „professionelle“ regulatorische T-Zellen, proliferieren in der Peripherie und erwerben einen Effektor/Memory-Phänotyp (Frey et al., 2005). CD4+CD25+ Zellen sind anerge, wenig proliferierende Zellen, die nur wenig Zytokine sezernieren. Sie machen sowohl bei Menschen als auch im Maussystem circa 10% aller peripherer CD4+ T-Zellen aus (van Roon et al., 2006). Ihre wichtigste Aufgabe besteht darin, sowohl die CD4 als auch die CD8-Population der T-Zellen in ihrer Proliferation und Zytokinproduktion zu hemmen. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 scheint direkt mit der Suppressorfunktion der nTreg verbunden zu sein, denn es ist in vitro gelungen, CD4+CD25- T-Zellen durch retroviralen Transfer des FoxP3-Genes in CD25-exprimierende nTreg zu transformieren (Yagi et al., 2004).

Die Suppression der Immunantwort durch nTreg wird durch Zell-Zell-Kontakte vermittelt. Durch diese Interaktion sind nTreg in der Lage, die Zytokinproduktion, insbesondere die IL-2-Produktion von Effektorzellen einzuschränken und diese Zellen in ihrem Zellzyklus zu arretieren. Ein weiterer Weg der Beeinflussung der Immunreaktion durch nTreg besteht im Zell-Zellkontakt mit antigenpräsentierenden Zellen, der zu einer Downregulation von CD80 und CD86 und somit zu einer verringerten Fähigkeit zur Stimulation von Effektor-T-Zellen führt. Darüberhinaus wird auch die Zytokinproduktion von Monozyten, insbesondere TNF- α

und IL-6 gehemmt (Taams et al., 2005; van Roon et al., 2006).

Am Modell der experimentellen Antigen-induzierten Arthritis der Maus konnte gezeigt werden, dass eine Depletion der CD4+CD25+ T-Zellen durch einen monoklonalen antiCD25 Antikörper zu einer klinisch und histologisch nachweisbaren Erhöhung der Schwere der Arthritis führt. In vitro führte diese Depletion zu einer vermehrten Proliferation stimulierter T-Zellen. Dies betraf sowohl T-Zellen der Th1- als auch T-Zellen der Th2-Subpopulation. Dementsprechend konnte die Verabreichung aufgereinigter und aktivierter CD4+CD25+ Zellen eine signifikante Verringerung der klinischen und histologischen Arthritis-Schwere in diesem Modell hervorrufen (Frey et al., 2005). Dies wirft jedoch die Frage auf, warum es in der humanen Rheumatoiden Arthritis trotz vorhandener und im Modell auch suppressiv wirksamer nTregs zur Ausprägung einer persistierenden Autoimmunreaktion kommt. Es wird vermutet, dass nTreg-Zellen rheumatoider Patienten wohl in der Lage sind, die Proliferation, jedoch nicht die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Effektor-T-Zellen zu supprimieren (Ehrenstein et al., 2004). Im entzündeten Gelenk sind zudem reichlich Zytokine wie IL-7, IL-15 und TNF- α vorhanden, von denen bekannt ist, dass sie die regulatorische Aktivität von nTreg unterdrücken können. Zudem ist bekannt, dass eine TNF- α -Blockade die supprimierende Funktion von CD4+CD25+ Zellen verstärkt. Auch reife dendritische Zellen sind in der Lage, über verschiedene Mechanismen die T-Zell-vermittelte Hemmung der immunologischen Entzündungsreaktion zu unterdrücken (van Roon et al., 2006).

2.3.5. Th-Zell-Subpopulationen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Im arthritischen Gelenk findet man eine deutliche Kumulation von CD4-positiven T-Zellen, also Th-Zellen. In Verbindung mit der genetischen Prädisposition zur Ausprägung einer RA durch bestimmte MHC-II-gekoppelte Allele legt dies eine wichtige Rolle der Th-Zellen bei der Induktion und Erhaltung des Entzündungsgeschehens im arthritischen Gelenk nahe.

Es konnte gezeigt werden, dass in der arthritischen Synovialmembran ausreichende Mengen des Th1-Zytokins IFN- γ vorhanden sind, um vermittelt über eine Induktion von GM-CSF die Lebensdauer von makrophagenähnlichen Typ A-Synoviozyten deutlich zu erhöhen sowie die Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, LFA-3, VCAM-1) durch Synoviozyten zu induzieren (Dolhain et al., 1996; Simon et al., 1994). Diese sezernieren in großen Mengen proinflammatorische Zytokine (TNF- α und IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18) und fördern damit die Entzündungsreaktion im Synovialgewebe. IFN- γ aktiviert zudem Makrophagen, die TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-12 produzieren. IL-1 β ist ein potenter Stimulator für die Produktion von matrixabbauenden Metalloproteinasen (MMP) durch

fibroblastenähnliche Synoviozyten vom Typ B. IFN- γ kann darüberhinaus die Expression von MHC-II-Molekülen durch Synovialzellen induzieren und somit eine Antigenpräsentation für Th-Zellen ermöglichen (Boots et al., 1994). Synoviale Fibroblasten verfügen weiterhin im Gegensatz zu dermalen und Bindegewebsfibroblasten über kostimulatorische Fähigkeiten für T-Zellen (Looney et al., 1995).

Parallel zu dieser proinflammatorischen Wirkung der Th1-Zellen nehmen Th2-Zellen regulatorischen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen durch die Sekretion von IL-4 und IL-10. Eine antiinflammatorische Wirkung von IL-4 und IL-10 konnte jedoch bis heute nur indirekt nachgewiesen werden: IL-4 kann die durch IL-1 β stimulierte Sekretion von MMP-1 und MMP-3 durch Typ B-Synovialzellen deutlich vermindern (Borghaei et al., 1998), die Zugabe von Anti-IL-10-Antikörpern kann in vitro die Expression proinflammatorischer Zytokine erhöhen.

Th-Zellen regulieren somit die Aktivität von Makrophagen, Synoviozyten und B-Zellen regulieren, ohne direkt an der Gelenkdestruktion beteiligt zu sein (Dayer and Burger, 1999).

2.4. Die Rolle der Makrophagen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Die Makrophagen stellen eine entscheidende Schlüsselposition im heutigen Pathogenesemodell der RA dar.

Sie gehören, wie die dendritischen Zellen zu den sogenannten Antigenpräsentierenden Zellen. Diese sind in der Lage, durch Präsentation von körperfremden Antigenpeptiden ebenso wie von Autoantigenen über MHC II-Moleküle sowie kostimulatorische Faktoren, insbesondere CD-80 und CD-86, eine Aktivierung spezifischer T-Lymphozyten hervorzurufen (Jenkins et al., 2001). Man nimmt weiterhin an, dass die sogenannte Selbst/Fremd-Entscheidung von den Zellen des angeborenen Immunsystemes, zu denen die Makrophagen zählen, vorgenommen wird. Hierzu besitzen sie sogenannte Toll-Like-Rezeptoren (TLR). Dabei handelt es sich nicht um klonale Rezeptoren wie die T-Zell-Rezeptoren sondern vielmehr um evolutionär hochkonservierte spezifische Rezeptoren für bestimmte molekulare Muster, die nur bei Mikroorganismen, nicht jedoch beim Menschen vorkommen. Man nennt diese auch PAMP, pathogen-associated molecular pattern. Ein solches bedeutendes molekulares Muster ist das Lipopolysaccharid (LPS), das in den Zellwänden vieler Bakterien vorkommt. Aus diesem Grunde erfolgte die Stimulation der Makrophagen in der Zellkultur durch dieses Lipopolysaccharid. Erst durch diese Aktivierung erfahren die Makrophagen eine Reihe von Veränderungen, die für die Induktion einer T-Zell-Antwort notwendig sind.

Darüberhinaus sind Makrophagen auch Effektorzellen der T-Zell-Immunantwort. Die von

Th1-Zellen sezernierten Zytokine, insbesondere IFN- γ und TNF β , aktivieren Makrophagen zur Produktion von proinflammatorischen Faktoren wie TNF- α und IL-6.

In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Makrophagen im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis nicht nur im arthritischen Gelenk sondern auch systemisch aktiviert sind. So ließ sich am Modell der AIA nachweisen, dass die Serumlevel an TNF- α , IL-1 β und IL-6 in arthritischen Tieren wesentlich ansteigen, verglichen mit einer gesunden Population. Die systemische Aktivierung des Monozyten-Makrophagen-Systemes scheint also auch eine wichtige pathogenetische Rolle bei der Rheumatoiden Arthritis zu spielen (Simon et al., 2001).

2.5. Die Rolle der Synoviozyten in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Die Gelenkkapsel besteht aus zwei verschiedenen Zellarten. Man unterscheidet makrophagenähnliche Typ A-Synoviozyten von fibroblastenähnlichen Typ B-Synoviozyten.

Dabei kommen Typ A-Synoviozyten insbesondere in den luminalen Schichten der Synovialis vor, während Typ B-Synoviozyten auch in den tieferen Synovialsschichten existieren.

Typ A-Synoviozyten sind nicht fest im Gewebeverband fixierte Zellen, die die Fähigkeit zur aktiven Phagozytose von Synovialflüssigkeit, Zelltrümmern, Mikroorganismen sowie verschiedenen Antigenen in der Gelenkflüssigkeit und der Matrix der synovialen Intima besitzen. Man findet auf der Oberfläche dieser Zellpopulation MHC Klasse II, die makrophagenähnlichen Typ A-Synoviozyten können also als Antigen präsentierende Zellen fungieren (Iwanaga et al., 2000; Nozawa-Inoue et al., 1998). Ihnen kommt somit eine wichtige Rolle im Initialstadium einer Gelenkentzündung zu. Sie leiten sich von der Monozyten/Makrophagen-Reihe ab und sind wohl am ehesten als gewebständige Makrophagen, ähnlich den Kupffer'schen Zellen in der Leber zu verstehen. Die Typ A-Synoviozyten wandern erst im Laufe der Neonatalentwicklung aus den Blutgefäßen in die Synovialmembran ein. Sie sind in der Lage, verschiedene lysosomale Enzyme, wie die Nicht-spezifische Esterase (NSE), saure Phosphatase oder Kathepsine zu sezernieren. Diese Enzyme sind im Falle einer Gelenkentzündung stark erhöht (Kiyoshima et al., 1994).

Typ B-Synoviozyten haben eine komplizierte dreidimensionale Struktur, die von weiten Zellausläufern gekennzeichnet ist. Mit diesen Zellausläufern bilden sie ein dichtes Netzwerk entlang der synovialen Intima. Sie haben sekretorische Funktionen, insbesondere Kollagene, Fibronektin, Hyaluronsäure und Glucosaminoglykane werden ins Gelenklumen abgegeben. Typ B-Zellen sind in der Lage, die Proteinzusammensetzung der Synovialflüssigkeit zu kontrollieren. Man nimmt an, dass insbesondere große Proteinmoleküle durch aktiven

Transport bzw. Sekretion der Typ B-Zellen die Synovialflüssigkeit erreichen, während niedermolekulare Substanzen wie Glukose oder Elektrolyte aus dem Serum stammen. Es besteht jedoch eine Blut-Gelenkschranke, die den freien Substanz Austausch unterbindet. Sie wird im Wesentlichen durch die selektive Permeabilität der Grundsubstanz gebildet, wahrscheinlich sind die Typ B-Zellen auch aktiv an der Aufrechterhaltung dieser Schranke beteiligt (Iwanaga et al., 2000). Darüber hinaus wurde auch eine mögliche rezeptorische Funktion der Typ B Zellen beschrieben (Linck and Porte, 1981).

Für die synoviale Intima wurden epithelähnliche Strukturmerkmale beschrieben. So weisen die Synoviozyten eine mehr oder weniger epitheloide Anordnung auf. Allerdings bilden die Synoviozyten eine diskontinuierliche Schicht von Zellen, so dass die Synovia auf ca. 20-50% der Oberfläche in direkten Kontakt mit der Interzellulärmatrix der synovialen Intima tritt (McDonald and Levick, 1988). Außerdem kommt teilweise eine Basalmembran vor, die jedoch keine abgeschlossene Schicht und somit keine kontinuierliche Begrenzung hin zu tieferen Schichten des Bindegewebes bildet. Die TypB-Synoviozyten können also als eine Art spezialisierte Fibroblasten mit sekretorischer, sensorischer und kontraktile Funktion aufgefasst werden (Iwanaga et al., 2000).

Insbesondere die TypB-Synoviozyten scheinen eine wichtige Rolle bei der Knorpel- und Knochenschädigung im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis einzunehmen. Sie zeigen im arthritischen Gelenk eine erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1, Fibronectin, Vitronectin und CD44 (Firestein, 1996). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Einwanderung von Entzündungszellen in das arthritische Gelenk (van Dinther-Janssen et al., 1994; Wilkinson et al., 1993). Ein grundlegendes morphologisches Merkmal der Rheumatoiden Arthritis ist die Hyperplasie der synovialen Deckzellschicht. Hierfür sind proliferierende TypB-Synoviozyten in erster Linie verantwortlich. Dies belegen elektronenmikroskopische Untersuchungen der proliferierenden murinen Synovialis (Tanaka et al., 1988). In der Knorpel- und Knocheninvasionszone des Pannus humaner RA-Gelenke können ebenso transformierte Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten nachgewiesen werden (Fassbender, 1983; Shiozawa et al., 1983) wie im Mausmodell (Tanaka et al., 1988). TypB-Synoviozyten sind in der Lage, knorpel- und knochendestruierende Enzyme zu sezernieren, insbesondere die Matrixmetalloproteinasen (MMP) Kollagenase und Stromelysin (Hiraoka et al., 1992), aber auch verschiedene Kathepsine (Keyszer et al., 1995). Die Inhibitoren der gewebsdestruierenden Enzyme, u.a. TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) werden ebenfalls in den TypB-Synoviozyten synthetisiert, ihre Produktion ist bei der Rheumatoiden Arthritis deutlich weniger hochreguliert. Ein sehr wichtiger pathogenetischer Aspekt ist das Zytokinnetzwerk in der synovialen Deckzellschicht des RA-Gelenkes. Man findet einen sehr

hohen Anteil an fibroblasten- und makrophagentypischen Faktoren, verglichen mit T-Zell-Zytokinen (Firestein and Zvaifler, 1990). Es konnte durch In-situ-Hybridisierungstechniken gezeigt werden, dass die synoviale Deckzellschicht der Ursprungsort dieser großen Zytokinmengen ist. Dabei entstammen IL-1 β , TNF- α , GM-CSF und verschiedene Chemokine vorrangig den Typ A-Synoviozyten, während Typ B-Zellen vorrangig IL-6 und angiogenetische Faktoren wie FGF und VEGF produzieren (Ben-Av et al., 1995; Sano et al., 1990). Die Interaktionen zwischen benachbarten Typ A- und Typ B-Synoviozyten auf Zytokinebene führen dabei zu einer selbstunterhaltenden Synovitis. So induzieren IL-1 β und TNF- α der Typ A-Synoviozyten die Produktion proinflammatorischer Zytokine in Typ B Zellen. Dieses Zytokinmuster begünstigt eine Reihe weiterer Vorgänge, die zur Unterhaltung und Verstärkung der Entzündungsreaktion beitragen: Es kommt zur Angiogenese (z.B. durch FGF, TNF- α , VEGF, IL-8), zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. durch TNF- α , IL-1 β) sowie zur chemotaktischen Stimulation der Einwanderung von Entzündungszellen (Firestein, 1996).

Durch parakrine und autokrine Einflüsse dieser Faktoren auf die Synoviozyten selbst sowie auf verschiedene Entzündungszellen kommt es zur Selbstunterhaltung der Entzündungs- und Destruktionsvorgänge.

Es ist auch die Möglichkeit diskutiert worden, dass fibroblastenähnliche Synoviozyten eine Transformation durchmachen, die sie zur autonomen Invasion des Gelenkknorpels befähigt. Hierfür sprechen die Fähigkeit von fibroblastenähnlichen Synoviozyten, unter bestimmten Umständen anders als normale Fibroblasten in Kultur ohne Oberflächenanhaftung zu gedeihen sowie die aufgehobene Kontakthemmung des Wachstums in Kultur. Außerdem konnte gezeigt werden, dass arthritische fibroblastenähnliche Synoviozyten verschiedene Onkogene exprimieren, so beispielsweise c-myc. Als Ursache dieser Transformation kämen neben somatischen Mutationen auch Retroviren, die zu DNA-Schäden führen, in Frage (Firestein, 1996).

2.6. Bisherige Therapiekonzepte für die Rheumatoide Arthritis

2.6.1. Etablierte Therapiekonzepte

Grundsätzlich muss unterschieden werden zwischen antiphlogistisch wirksamen Medikamenten, die die akute Entzündung dämpfen und damit auch eine schnelle symptomatische Wirkung zeigen und den Pharmaka, die den langfristigen chronischen Verlauf der Erkrankung beeinflussen sollen. Insbesondere eine Verminderung der

Gelenkdestruktion sowie die Senkung der extraartikulären Manifestationen der RA sind Ziel einer solchen Therapie.

Die vor allem analgetisch und antiphlogistisch wirksamen nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) können in erster Linie die akute Entzündung und damit Schmerzsymptomatik und Gelenkfunktion, jedoch nicht die Gelenkdestruktion beeinflussen. Zum Einsatz kommen Salicylsäurederivate, Arylessigsäurederivate (Indometacin, Diclofenac), Arylpropionsäurederivate (Ibuprofen) und Oxicame (Piroxicam). Die überwiegend gastrointestinalen Nebenwirkungen stellen einen limitierenden Faktor für den Einsatz dieser Medikamente dar.

In der akuten Entzündungsphase der RA steht noch immer die Therapie mit Glukokortikoiden im Vordergrund. Sie wirken antiphlogistisch und immunsuppressiv. Die Gabe erfolgt kurzfristig im Sinne einer „Stoßtherapie“ mit initial 20-30mg, einer Pulstherapie mit bis zu 1g Methylprednisolon über drei Tage bzw. langfristig in niedrigerer Dosierung. Gerade bei einer Verabreichung über längere Zeit sind dabei Nebenwirkungen im Sinne einer Cushing-Symptomatik, vor allem aber die Entwicklung einer Osteoporose unausbleiblich.

Man versucht daher die Langzeiteinstellung der RA mit sogenannten Basistherapeutika. Diese Medikamente gelten als „disease modifying antirheumatic drugs“ (DMARD), sie können die Gelenkdestruktion vermindern bzw. die Progression verzögern. Mit dieser Therapie ist eine Modulation des Krankheitsverlaufes möglich, jedoch kein Aufhalten der Progression der Gelenkdestruktion. Als klassische Basistherapeutika werden insbesondere Sulfasalazin, D-Penicillamin, Chloroquin und Goldverbindungen wie Aurothiomalat bei mildem bis moderatem Krankheitsverlauf eingesetzt. Diese Medikamente müssen frühzeitig zum Einsatz kommen, um eine Beeinflussung des Krankheitsverlaufes zu ermöglichen, was nur in etwa 2/3 der Patienten gelingt. Die ausgeprägten vielfältigen Nebenwirkungen machen eine engmaschige Kontrolle der Patienten erforderlich.

Immunsuppressiva, vor allem Methotrexat und Azathioprin, sind schweren Krankheitsverläufen vorbehalten, die gekennzeichnet sind durch hohe Entzündungswerte, das Vorhandensein von hohen RF-Titern sowie Blutbildveränderungen. In weiterhin therapieresistenten Patienten kann auch Cyclosporin A als T-Zell-gerichtetes Immunsuppressivum zum Einsatz gelangen (Cush et al., 1999). Die immunsuppressive Therapie hat sich als sehr wirksam erwiesen, allerdings ist das Risiko des Auftretens von Nebenwirkungen, insbesondere Hepato- und Hämatotoxizität beträchtlich. Die Gabe von Cyclophosphamid erfolgt nur in schwersten Fällen, vor allem aufgrund des erhöhten Risikos der Ausbildung maligner Tumoren.

Häufig erfolgt die Kombinationen dieser Therapeutika, um über verschiedene

Wirkmechanismen eine bessere Beeinflussung der Krankheitsaktivität bei verminderter Nebenwirkungsrate zu erreichen.

2.6.2. Neue Entwicklungen

Gegenwärtig wird die Möglichkeit der Beeinflussung der Krankheitsaktivität mittels „biologisch wirksamer Medikamente“ (Moreland et al., 1997) in immer stärkerem Maße in der klinischen Therapie der Rheumatoiden Arthritis genutzt. Hierzu zählt allen voran die therapeutisch sehr effiziente Blockade des proinflammatorischen Zytokines TNF- α durch monoklonale Antikörper (mAb) wie Infliximab oder Adalimumab (Gartlehner et al., 2006; Gatto, 2006; Voulgari and Drosos, 2006). Allerdings mehren sich auch die Hinweise, dass diese TNF- α -Blockade durch eine Antikörper-Therapie über längere Zeit signifikant das Risiko von Malignomen und schweren systemischen Infektionen erhöht (Bongartz et al., 2006).

In den letzten Jahren hat auch die Blockade des proinflammatorischen IL-6 in frühen klinischen Studien erfolversprechende Resultate in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis erzielt (Connell and McInnes, 2006). Antikörper gegen weitere proinflammatorische Zytokine, wie IL-15, IL-18 oder IL-23 werden hinsichtlich einer möglichen klinischen Anwendbarkeit in der Rheumatoiden Arthritis untersucht (Connell and McInnes, 2006). IL-17 als Markerzytokin der regulatorischen T-Zellen wird ebenfalls als möglicher Angriffspunkt einer Zytokinblockade, in diesem Fall entweder direkt durch monoklonale Antikörper oder durch Vakzinierung mit rekombinantem, an virusähnliche Partikel gebundenem IL-17 angesehen (Rohn et al., 2006; Wraith, 2006).

Der B-Zell-depletierende monoklonale Antikörper Rituximab ist mittlerweile als Therapieoption bei Versagen einer Behandlung mit Anti-TNF- α -Antikörpern zugelassen (Dass et al., 2006).

T-Helfer-Zellen kommt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis zu. Sie exprimieren den Rezeptor CD4, der daher Ziel verschiedener experimenteller Therapieregimes wurde. Es konnte gezeigt werden, dass eine Therapie der Antigen-induzierten Arthritis der Maus als Modell der Rheumatoiden Arthritis mit dem depletierenden anti-CD4-Antikörper GK1.5 zu einer signifikanten Reduktion der klinischen Ausprägung der Arthritis und zu einer verringerten histologischen Destruktion des arthritischen Gelenkes führt. Die T-Zell-Reaktivität in vivo ist insgesamt gesenkt und insbesondere die Produktion proinflammatorischer Th1-Zytokine geht zurück (Pohlers et al., 2004).

Röntzsch et al. (2004) konnten zeigen, dass auch Dehydroepiandrosteron, ein natürliches Androgen in der Lage ist, die Knieschwellung und die histologische Gelenkzerstörung im Modell der antigeninduzierten Arthritis der Maus zu hemmen.

2.7. Experimentelle Modelle der Arthritis

Die bislang noch ungenügend bekannte Ätiologie der Erkrankung und fehlende kausale Therapiemöglichkeiten machen den Bedarf an weiterem Erkenntnisgewinn deutlich. Man benötigt ein Modell mit definierten, reproduzierbaren Krankheitsbedingungen, um sowohl Kausalzusammenhänge zu untersuchen als auch daraus abgeleitete neue Therapiestrategien erproben zu können.

Hierfür eignen sich verschiedene tierexperimentelle Modelle der RA, denen jedoch gemeinsam ist, dass keines dieser Modelle der Erkrankung vollständig gleicht. Diesen Modellen liegt die Induktion einer Mono- oder Polyarthritis durch physikalische, infektiöse oder immunologische Mechanismen in Versuchstieren zugrunde. Die Arthritiden auf immunologischer Basis zeichnen sich durch die größte Übereinstimmung hinsichtlich des chronischen Verlaufes, der histologischen Veränderungen und therapeutischen Beeinflussungsmöglichkeiten mit der RA aus.

Folgende tierexperimentelle Arthritismodelle sind derzeit etabliert (Tabelle 2).

Tabelle 2: tierexperimentelle Arthritismodelle (Burkhardt and Kalden 1997) (Burkhardt and Kalden, 1997)

Adjuvans-Arthritis (AA):	Entwicklung einer Polyarthritis bei Ratten durch subkutane Injektion von Mykobakterien in Freund'schen Adjuvans (CFA) (Pearson, 1956)
Antigen-induzierte Arthritis (AIA):	Entwicklung einer monoartikulären Arthritis durch subkutane Immunisierung mit einem Antigen in CFA und intraartikuläre Injektion des Antigens zur Induktion der Arthritis bei der Maus (Brackertz et al., 1977a); in Kaninchen (Dumonde and Glynn, 1962); bei Meerschweinchen (Loewi, 1968); und später bei Ratten (Griffiths et al., 1992)
Kollagen-induzierte Arthritis (CIA):	Entwicklung einer Polyarthritis durch subkutane Injektion von naivem Kollagen Typ II in komplettem oder inkomplettem Freund'schen Adjuvans (Courtenay et al., 1980; Trentham et al., 1977)
Öl- (OIA) und Pristan-induzierte Arthritis	Entwicklung einer Polyarthritis bei DA-Ratten durch subkutane Injektion von Mineralöl (inkomplettes Freund'sches Adjuvans) oder synthetischem Öl (Pristan) (Kleinau et al., 1991); Entwicklung einer Polyarthritis bei der Maus durch intraperitoneale Injektion von Pristan (Potter and Wax, 1981)
Proteoglykan-induzierte Arthritis (PGIA)	Entwicklung einer Polyarthritis bei Balb/c-Mäusen durch wiederholte intraperitoneale Injektion Proteoglykanen (Glant et al., 1987)
Streptokokken-Zellwand-induzierte Arthritis (SCWIA)	Entwicklung einer chronischen Arthritis mit Spontanexazerbation bei der Ratte durch einmalige Gabe von Zellwandbestandteilen von Streptococcus pyogenes (Cromartie et al., 1977)
spontane Arthritis der MRL-lpr/lpr-Maus	Entwicklung einer spontanen Arthritis bei dem autoimmunen Mausstamm MRL-lpr/lpr (Hang et al., 1982)
HLA-B27 Arthritis	Entwicklung einer symmetrischen Polyarthritis mit extraartikulärer Beteiligung bei HLA-B27 transgenen Ratten unter nicht keimfreien Bedingungen (Taurog et al., 1994)
Human-murine Arthritis	Humane Synovialmembran und Knorpel werden zur Beobachtung von Zell-Knorpelinteraktionen unter die Nierenkapsel von SCID-Mäusen verpflanzt (Geiler et al., 1994). Synovialmembran oder synoviale Fibroblasten aus RA-Patienten werden in das Kniegelenk von SCID-Mäusen verpflanzt oder gespritzt (Sack et al., 1994)
TCR-transgene Arthritis (K/BxN Maus-Arthritis)	T-Zell-Rezeptor transgene C57BL/6-Mäuse mit dem „KRN-Rezeptor“ werden mit NOD-Mäusen gekreuzt. Die F1-Generation (K/BxN-Maus) entwickelt spontan eine periphere symmetrische Polyarthritis, Antigen ist die ubiquitär vorkommende Glucose-6-Phosphat-Isomerase (Kamradt and Schubert, 2005; Korganow et al., 1999; Matsumoto et al., 1999)
G6PI-Arthritis	Die systemische Immunisierung genetisch normaler Mäuse mit Glucose-6-phosphat-Isomerase induziert eine T-Zell-abhängige, chronische periphere symmetrische Polyarthritis (Schubert et al., 2004)

2.8. Die Antigen-induzierte Arthritis

Die Antigen-induzierte Arthritis ist eine chronische, antigenspezifische, T-Zell-abhängige Arthritis, die ursprünglich von DUMONDE und GLYNN (1962) am Kaninchen entwickelt wurde (Dumonde and Glynn, 1962). Später wurde sie auch in Meerschweinchen (Loewi, 1968), Mäusen (Brackertz et al., 1977a) und Ratten (Griffiths et al., 1992) ausgelöst.

Hierbei erfolgt zunächst die Immunisierung mit einem Antigen in komplettem Freund'schen Adjuvans. Die Induktion der Arthritis erfolgt durch intraartikuläre Injektion des Antigens. Dadurch wird eine akute Entzündungsreaktion ausgelöst, die im weiteren Verlauf persistiert und zu destruktiven Veränderungen im Gelenk führt. Die Inzidenz dieses Modelles beträgt 100%, d.h. jedes behandelte Tier erkrankt.

Wir haben in unseren Untersuchungen das von Brackertz et al. (1977a) beschriebene Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus verwendet.

Es erfolgt zunächst die zweimalige Immunisierung der Tiere mittels methyliertem Rinderserumalbumin (mBSA) als Antigen in komplettem Freund'schem Adjuvans (CFA) zur Erzeugung einer Hyperreaktivität. Diese Reaktionslage kann durch intraperitoneale Verabreichung von attenuierten bakteriellen Erregern (*Bordetella-pertussis*-Bakterien) verstärkt werden. Diese induzieren die Sekretion von IL-12, einem potenten Stimulus zur Freisetzung von IFN- γ durch Th1-Zellen und NK-Zellen. Es kommt zur T-Zell-Aktivierung sowie zur Proliferation antigenspezifischer B-Zellen, die sich zu immunglobulinsezernierenden Plasmazellen differenzieren.

Die Induktion der Arthritis erfolgt durch eine intraartikuläre Injektion des Antigens mBSA. Es kommt rasch zur Ausbildung einer sogenannten Arthus-Reaktion, bei der sich Immunkomplexe aus dem injizierten Antigen und einem Überschuss an Antikörpern bilden und sich im Bereich der Oberflächen des hyalinen und fibrösen Gelenkknorpels anlagern. Das Vorhandensein der Immunkomplexe führt zur Aktivierung des Komplementsystems und damit zur beginnenden Entzündungsreaktion mit einem dichten Infiltrat von polymorphkernigen Neutrophilen und Makrophagen, die durch chemotaktische Faktoren, insbesondere IL-8 angelockt werden (Cooke et al., 1983, 1985). Bereits in den ersten Stunden nach der Arthritisinduktion kommt es zur elektronenmikroskopisch nachweisbaren Schädigung der Knorpeloberfläche sowie zum fortschreitenden Verlust von Proteoglykanen aus der Knorpelmatrix. In der Folge entstehen Chondrozytennekrosen und Defekte der Kollagenfaserstruktur. Nach einigen Tagen wandern T-Zellen in das entzündete Synovium ein. Ihnen kommt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der an der

Entzündungsreaktion beteiligten Makrophagen, Synoviozyten und B-Zellen zu (Dayer and Burger, 1999). Nach etwa 7 Tagen hat die akute Entzündungsphase ihren Höhepunkt erreicht. Morphologisch stellen sich tiefe Knorpelstrukturdefekte mit eröffneten Chondrozytenlakunen und eingewanderten Lymphozyten und Makrophagen dar. Diese akute Entzündungsphase ist auch gekennzeichnet durch eine vermehrte Produktion von Matrixmetalloproteinasen wie MMP-3 (Stromelysin-1), MMP-12 (Makrophagenelastase) und MMP-13 (Kollagenase 3), die an der Knorpel- und Knochenschädigung im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis einen bedeutenden Anteil haben (Schurigt et al., 2005).

Im weiteren Verlauf, der der chronischen Phase entspricht, stehen histologisch ein granulozytäres Infiltrat sowie die Proliferation der Fibroblasten im Vordergrund, die als Reparaturmechanismus gedeutet werden kann (Henzgen et al., 1996).

Das histopathologische Bild der Gelenkdestruktion der Antigen-induzierten Arthritis im Mausmodell ähnelt dem der Rheumatoiden Arthritis des Menschen: es finden sich eine synoviale Hyperplasie, ein mononukleäres Infiltrat der Synovialmembran, polymorphkernige Lymphozyten im Gelenkspalt sowie die Destruktion von Knorpel und Knochen (Petrow et al., 1996).

Im Verlauf der Erkrankung finden sich Antikörper gegen im Knorpel enthaltenes Kollagen Typ II und Proteoglycane. Diese chronischen Autoimmunreaktionen können durch steroidale Antirheumatika wie Prednisolon, Dexamethason (Hunneyball et al., 1986a) und durch Second-Line-Antirheumatika wie das T-Zell-spezifische Immunsuppressivum Cyclosporin (Brauer et al., 1994), Azathioprin, Sulfasalazin oder Dapson (Hunneyball et al., 1986b) gehemmt werden.

2.9. Second-Messenger-Systeme der Zelle und deren Regulationsmechanismen

Hormone und Mediatorstoffe übertragen als körpereigene chemische Signalstoffe interzelluläre Informationen. Somit ist die Koordination von Funktion und Stoffwechsel von Erfolgsorganen durch die Einstellung verschiedener definierter Bedingungen möglich. Für die Umsetzung des Signals der veränderten Hormonkonzentration in Stoffwechselreaktionen der Zellen gibt es verschiedene Wege. Hormone können intrazellulär aufgenommen werden und die Genaktivität in Zellen direkt beeinflussen oder an verschiedene membranständige Rezeptoren binden. Manche Rezeptoren werden mit dem gebundenen Hormon aufgenommen, lysosomal abgebaut und vermitteln die Wirkung durch die Abbaufragmente. Andere Rezeptoren dienen als steuerbare Ionenkanäle, die in Abhängigkeit von der Bindung des Hormones oder Mediatorstoffes die intrazelluläre Ionenkonzentration beeinflussen.

Sehr viele membranständige Rezeptoren vermitteln die Information unter Einbeziehung eines sogenannten Second-Messenger-Systems. Second Messenger sind intrazelluläre Substanzen, deren Konzentration durch die Wechselwirkung von extrazellulären molekularen Signalen, sogenannten „first Messengers“, mit Rezeptoren in der Zellwand gesteuert wird. Auf diese Weise wird das Signal des „first Messengers“ in der Zelle weitervermittelt. Als Liganden für die Rezeptoren in Extrazelluläräumen kommen beispielsweise Neurotransmitter, Hormone, Zytokine, Mediatoren etc. in Frage. Welche Reaktionen durch die Veränderung der Konzentration des second Messengers in der Zelle ausgelöst werden, hängt dabei vor allem von der Art der Zielzelle ab. Die Wirkungen können dabei je nach Zielzelle vollkommen verschieden oder sogar antagonistisch sein. Außerdem besitzt dieses System den Vorteil eines Verstärkungseffektes des Signales durch den „second Messenger“.

Als „second Messenger“ können beispielsweise Diacylglycerin, Arachidonsäure oder Inositol-1,4,5-triphosphat fungieren. Die verbreitetsten und entwicklungsgeschichtlich ältesten „second Messenger“ sind jedoch 3':5'-zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und 3':5'-zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Die intrazelluläre regulatorische Funktion von cAMP wurde bereits vor mehr als 30 Jahren beschrieben. Dieses System wird durch Bindung eines extrazellulären Hormons oder Mediators an einen transmembranären Rezeptor aktiviert, der wiederum an ein an der Membranninnenseite gelegenes heterotrimeres Protein, das sogenannte Guanin-Nucleotid-bindende Protein (G-Protein) bindet. Die nun aktivierte Untereinheit des G-Proteins lagert sich an eine Adenylatzyklase an und aktiviert diese. Dadurch ist diese in der Lage, Adenosintriphosphat unter Abspaltung von P-P in cAMP umzuwandeln. Bei diesem Vorgang erfolgt die Hydrolyse von GTP zu GDP an der Untereinheit des G-Proteins. Ist diese vollständig erfolgt, wird die Aktivierung der Adenylatzyklase beendet.

Eine Erhöhung der Konzentration von cAMP bzw. cGMP resultiert in der Aktivierung der Proteinkinasen A und G. Diese Kinasen können verschiedene Substrate, darunter Transkriptionsfaktoren und Ionenkanäle phosphorylieren. Hierdurch können verschiedenste Stoffwechselwege und Zellfunktionen reguliert werden, u.a. auch der Aktivierungsstatus verschiedener Zellen.

2.10. Phosphodiesterasen als Regulatoren der Second-Messenger-Konzentration im Zytoplasma

Für die Inaktivierung des entstandenen cAMP bzw. cGMP sind Phosphodiesterasen verantwortlich. Sie spalten cAMP bzw. cGMP hydrolytisch in die korrespondierenden

5-Monophosphate. Die Phosphodiesterasen können in insgesamt 11 verschiedene Familien in Abhängigkeit von ihren regulatorischen Fähigkeiten und ihrem Substrat (cAMP oder cGMP) klassifiziert werden. Man bezeichnet diese Isoenzymfamilien mit PDE I-XI. Sie sind in verschiedenen Geweben unterschiedlich verteilt.

Die Phosphodiesterase I-Familie umfasst Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Enzyme, die insbesondere in Purkinjezellen und der Herzmuskulatur vorkommen. Die cGMP-stimulierte Isoenzymfamilie II findet man in Zellen des zentralen Nervensystems sowie in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde. Die Verteilung der cGMP-inhibierten Familie III ist noch nicht ausreichend untersucht, beschrieben ist das Vorkommen im Herzmuskel, in der glatten Muskulatur, in Thrombozyten, Fett- und Leberzellen.

Das Isoenzym IV repräsentiert im zentralen Nervensystem den Großteil der hydrolytischen PDE-Aktivität. Außerdem ist die Phosphodiesterase Typ IV das vorherrschende Isoenzym in Leukozyten, wie Neutrophilen und Eosinophilen, T-Lymphozyten und Makrophagen und kommt zusammen mit anderen Isoenzymen in Gefäßendothelzellen vor. Innerhalb der Isoenzymfamilie IV können anhand der cDNA-Sequenz noch weitere Subfamilien unterscheiden werden, die mit Phosphodiesterase IVA-D bezeichnet werden. Über die Verteilung der einzelnen Subfamilien in unterschiedlichen Zellen und Geweben ist noch sehr wenig bekannt (Beavo and Reifsnnyder, 1990).

Die Aktivität der Phosphodiesterasen wird auf verschiedenen Ebenen durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. In einigen Zellarten erfolgt auch eine hormongesteuerte transkriptionelle Aktivierung der Phosphodiesterasegene. Einige Phosphodiesterase-Subtypen können auch cAMP-vermittelt phosphoryliert werden (Palacios et al., 1995).

2.11. Medikamentöse Beeinflussung der Aktivität der Phosphodiesterasen

Alle modernen Therapien basieren auf einer Modulation der Zellfunktion. Dies wird realisiert durch eine Interaktion von Therapeutika mit körpereigenen Makromolekülen, zu denen sie eine besondere Affinität besitzen. Klassischerweise geschieht diese Interaktion auf der Ebene der „first Messenger“ und wird durch Beeinflussung der Mediator-Rezeptor-Interaktion oder der Synthese-/Abbauenzyme der „first Messenger“-Substanzen reguliert. Ebenso konnte die Konzentration der „second Messenger“ cAMP bzw. cGMP bisher nur durch Einwirkung auf die entsprechenden „first-Messenger“-Systeme erreicht werden. Ein neuer Ansatz besteht in der Beeinflussung der Konzentration des „second Messengers“ selbst, indem das abbauende Enzym, die Phosphodiesterase inhibiert wird. An der einzelnen Zelle können somit ähnliche Effekte erzielt werden wie bei einer Beeinflussung auf der Ebene der „first Messenger“, durch

die genetische Heterogenität der Phosphodiesterasen und die unterschiedliche Verteilung der Isoenzyme in den Geweben kann jedoch eine spezifischere, gezieltere therapeutische Intervention stattfinden.

Die ersten therapeutischen Substanzen, die eine Inhibition der Phosphodiesterasen und damit eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels bewirkten, waren Methylxantine wie Theophyllin und Coffein (Butcher and Sutherland, 1962). Es handelt sich hierbei jedoch um nicht-selektive Phosphodiesterase-Inhibitoren, deren Nebenwirkungsspektrum sehr groß ist, da sie in sehr vielen Zellen des Organismus zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels führen. Über die Inhibition der Phosphodiesterase III werden beispielsweise kardiale Wirkungen (Frequenzsteigerung, positive Inotropie) sowie eine Vasodilatation vermittelt.

Auch alle strukturell von den Methylxantinen abgeleiteten Pharmaka waren entweder nicht effektiv oder zu toxisch. Zudem standen häufig andere Wirkmechanismen im Vordergrund, wie der Antagonismus am Adenosinrezeptor durch Theophyllin oder die Inhibition des Adenosin-Transports durch Dipyridamol (Beavo and Reifsnnyder, 1990).

In den letzten Jahren wurden verschiedene spezifische Phosphodiesterase IV-Inhibitoren entwickelt, die insgesamt in drei strukturelle Klassen eingeteilt werden können:

a) Die Struktur-Analogen von Rolipram

Rolipram, ursprünglich ein Antidepressivum, war der erste als spezifischer Phosphodiesterase IV-Inhibitor beschriebene Stoff. Es sind verschiedene Bindungsorte von Rolipram bekannt. Die Inhibitor-spezifische Domain der PDE IV für Rolipram liegt in einer kurzen Sequenz am Carboxyterminus der katalytischen Domain des Enzymproteins. Sie kann zwei verschiedene Konformationen annehmen, die früher als zwei voneinander verschiedene Bindungsorte angesehen wurden (Atienza et al., 1999). Dabei liegt die Konformation mit höherer Affinität vor allem in Zellen des Zentralnervensystems („high affinity rolipram binding site“) und die Konformation mit geringerer Bindungsaffinität gegenüber Rolipram („low affinity binding site“) in verschiedenen Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und T-Lymphozyten vor, an denen Rolipram seine antiinflammatorische Wirkung, wie die Inhibition der Ausschüttung der proinflammatorischer Zytokine TNF und IL-2 entfaltet (Schneider et al., 1986; Souness et al., 1996, 1997).

Seit der Beschreibung von Rolipram als selektiver Phosphodiesterase IV-Inhibitor wurden verschiedene Modifikationen an dessen chemischer Grundstruktur vorgenommen. Durch Austausch des Pyrrolidinon-Ringes im Rolipram mit Pyridylamid entstand der spezifischere und wirksamere Phosphodiesteraseinhibitor Piclamilast

(RP73401) (Palacios et al., 1995). Dieser ist bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich wirksam und zeigt nicht die Konformationsabhängigkeit seiner Bindungsaktivität wie Rolipram (Atienza et al., 1999).

b) Die Struktur-Analogen von Nitraquazone

Nitraquazone ist als antiinflammatorisch und analgetisch wirksamer Phosphodiesterase-Inhibitor beschrieben (Glaser and Traber, 1984). Durch verschiedene strukturelle Modifikationen entstand eine Reihe von Substanzen, die bis zur 14fachen Aktivität von Rolipram zeigten.

c) Strukturell von Xanthinen abgeleitete Substanzen

Seit mehr als 60 Jahren wird Theophyllin erfolgreich in der Asthmatherapie eingesetzt. Auch verschiedene andere Xanthinderivate mit bronchodilatatorischer Wirkung, jedoch ohne spezifische Phosphodiesteraseinhibitoreigenschaften, wie Pentoxifyllin oder Enprofyllin kamen zum Einsatz. Seither wurden verschiedene von der Xanthin-Grundstruktur abgeleitete Substanzen untersucht, die häufig eine bessere Bronchoselektivität als Theophyllin, jedoch im Allgemeinen nur eine geringe Verbesserung der Phosphodiesterase IV-Inhibition zeigten (Palacios et al., 1995).

2.12. Spezifische Phosphodiesterase IV-Inhibitoren als neue Therapieoption der Rheumatoiden Arthritis

Durch die Verteilung des Isoenzym IV der Phosphodiesterasen und die sich daraus ergebenden Stoffwechselbeeinflussungen ergibt sich ein breites Spektrum der Anwendungsmöglichkeit spezifischer Phosphodiesterase-IV-Inhibitoren.

Sowohl die bronchodilatatorische Aktivität, vermittelt durch die PDE IV in der glatten Bronchialmuskulatur als auch die antiinflammatorische und immunmodulatorische Wirkung dieser Substanzklasse in Verbindung mit dem Fehlen der PDE III-spezifischen kardialen Nebenwirkungen von Theophyllin lassen eine Anwendung als Antiasthmatica naheliegen. Ein weiterer wichtiger Mechanismus stellt die Modulation der Eosinophilenfunktion dar. PDE IV-Inhibitoren führen zu einer Verringerung der Mediatorfreisetzung durch Eosinophilendegranulation sowie zu einer Hemmung der Chemotaxis dieser Zellen.

T-Lymphozyten enthalten in ihrem Zytoplasma signifikante Mengen der Phosphodiesterasen IV und VII. Die T-Zell-Blastogenese kann durch PDE IV-Inhibitoren gehemmt werden. Die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α durch T-Lymphozyten und Makrophagen sowie IL-2 durch T-Lymphozyten kann durch PDE IV-Inhibitoren deutlich

gesenkt werden. Diese proinflammatorischen Zytokine spielen in der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen ebenso eine Schlüsselrolle wie beim septischen Schock oder im Rahmen des Adult Respiratory Distress Syndromes (ARDS). Die inhibitorischen Effekte auf bestimmte T-Zell-Funktionen legen eine Anwendung gegen Erkrankungen nahe, in deren Pathogenese die T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle spielen, wie atopische Dermatitis oder Rhinitis.

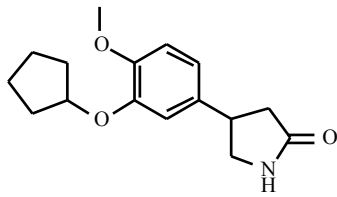
Auch die Interaktion von zirkulierenden Leukozyten und dem Gefäßendothel wird durch Phosphodiesterase-IV-Inhibitoren moduliert. Diese Interaktion führt zur Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche, zur Rekrutierung von zirkulierenden Immunzellen sowie zum Überwinden der Kapillarwand und Übertritt dieser Zellen ins entzündete Gewebe. Diese Vorgänge sind eine wichtige Basis aller Entzündungsreaktionen im Körper (Pober et al., 1993).

Das mögliche Anwendungsgebiet der immunmodulatorischen Wirkungen der spezifischen Phosphodiesterase-Inhibitoren reicht von der Rheumatoiden Arthritis oder Multiplen Sklerose bis hin zur Colitis ulcerosa, Diabetes oder Psoriasis. Auch ein Einsatz als Immunsuppressiva scheint denkbar (Palacios et al., 1995).

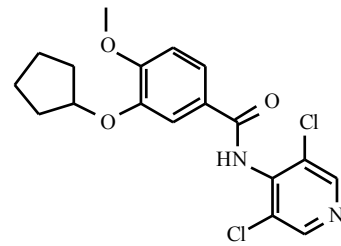
Wir haben in der vorliegenden Arbeit Rolipram als ersten selektiven Phosphodiesterase-Inhibitor sowie den spezifischeren, höher potenten Inhibitor RP73401 (Piclamilast) verwendet.

Rolipram als gut bekannter PDE IV-Inhibitor wurde bereits in verschiedenen Modellen akut und chronisch entzündlicher Erkrankungen mit Erfolg eingesetzt. Dabei konnte eine antiinflammatorische Wirkung sowohl klinisch als auch paraklinisch und histologisch in vivo nachgewiesen werden (Francischi et al., 2000; Ross et al., 1997). Die in vivo beobachteten Effekte konnten in vitro als cAMP-vermittelte immunmodulatorische Wirkungen auf verschiedene Schlüsselzellen des Immunsystems identifiziert werden.

Piclamilast oder RP73401 (3-Cyclopentyloxy-N-(3,5-dichloro-4-pyridyl)-4-methoxybenzamid), ein neuer spezifischer Phosphodiesteraseinhibitor, zeigte in verschiedenen Untersuchungen eine 300 bis 3000fach höhere inhibitorische Potenz auf das Phosphodiesterase-Isoenzym IV. Eine signifikante Inhibition tritt bereits im niedrig-nanomolaren Bereich ein. In ähnlichen Konzentrationsbereichen konnte eine Hemmung der TNF- α -Produktion durch Makrophagen nachgewiesen werden (Karlsson et al., 1995).



(1) Rolipram



(2) Piclamilast (RP73401)

Abb.1: Strukturformeln der selektiven Phosphodiesterase-Inhibitoren Rolipram und Piclamilast (RP73401)

3. Fragestellung und Ziele der Arbeit

Der Rheumatoide Arthritis kommt aufgrund der hohen Morbidität, der teilweise bis zur Funktionsunfähigkeit reichenden Gelenkveränderungen und der hohen Kostenbelastung eine hohe sozialmedizinische und gesellschaftliche Bedeutung zu. Mit den derzeit vorhandenen Medikamenten lässt sich der Progress der Erkrankung nur unzureichend beeinflussen. Ein kausaler Therapieansatz wird noch immer gesucht.

Phosphodiesterase IV-Inhibitoren bieten die Möglichkeit, durch spezifische Hemmung des Typ IV-Isoenzym der Phosphodiesterase, gezielter als bisher auf die Zellfunktion der Zellen des Immunsystems einzuwirken. Eine nebenwirkungsträchtige unspezifische Beeinflussung der Funktionen des Immunsystems kann somit vermieden werden. Erste Untersuchungen liegen in der vorgehend erwähnten Literatur bereits vor. Das experimentelle Modell der Antigen-induzierten Arthritis (AIA) der Maus ist aufgrund seiner Ähnlichkeiten zur humanen RA für die Bearbeitung solcher Fragestellungen sehr gut geeignet.

Ziel dieser Arbeit war es, den therapeutischen Einfluss von spezifischen Phosphodiesterase IV-Inhibitoren auf die akute und chronische Phase der Antigen-induzierten Arthritis der Maus zu erfassen. Als Vertreter der Phosphodiesterase IV-Inhibitoren wurden Rolipram und RP73401 (Piclamilast) verwendet. Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Kann eine therapeutische Wirksamkeit der Phosphodiesterase IV-Inhibitoren im Modell der AIA der Maus anhand der Kniegelenksschwellung sowie der histologischen Entzündungs- und Destruktionszeichen nachgewiesen werden?
- Ist in vivo eine Beeinflussung der T-Zell-Reaktivität und damit der „delayed-type hyperreactivity“ (DTH-Reaktion) nachweisbar?
- Bestehen Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit von Rolipram und RP73401 (Piclamilast)?
- Welche Dosis erweist sich im Modell der AIA der Maus als die wirksamste?
- Kann eine präventive und therapeutische Verabreichung der PDE IV-Inhibitoren eine Reduktion der Krankheitsaktivität in der akuten Phase der Arthritis sowie eine Verbesserung der Symptomatik in der chronischen Erkrankungsphase erzielen?

Aus der Bearbeitung der o.g. Problemstellungen ergibt sich die Frage nach den diesen Effekten zugrundeliegenden zellulären Pathogenesemechanismen und ihrer Beeinflussung durch die spezifischen Phosphodiesterase-Inhibitoren. Zur näheren Betrachtung dieser

Mechanismen sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Kann ein Einfluss der In-vitro-Applikation von Rolipram und RP73401 auf die Sekretion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen beobachtet werden?
- Welchen Einfluss haben die Phosphodiesterase-Inhibitoren auf die Lymphozytenproliferation in vitro?
- Wie wirkt sich eine in vitro Applikation von Phosphodiesterase-Inhibitoren auf das Zytokinspektrum von aktivierten Milzlymphozyten aus?
- Bestehen Hinweise auf eine Verschiebung des Th1-Th2-Gleichgewichtes durch die Therapie mit Phosphodiesterase-Inhibitoren in vitro?
- Kann eine Beeinflussung der Aktivität von arthritischen Synoviozyten durch Applikation der untersuchten Medikamente in vitro nachgewiesen werden?

Aus diesen Ergebnissen im Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus sollen Möglichkeiten für eine kausaler angreifende Behandlungsstrategie der humanen Rheumatoiden Arthritis abgeleitet werden.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Versuchstiere

Für alle Tierexperimente wurden weibliche C57BL/6-Mäuse im Alter von 6-10 Wochen verwendet. Die Tiere stammten vom Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena (Beutenberg-Campus, Jena) oder von Charles River Laboratories, Sulzfeld. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden; Fütterung mit Altromin-Pellets # 1326, Wasser ad libitum).

Alle Manipulationen der Versuchstiere wurden nur durch dafür qualifizierte Personen durchgeführt. Alle Tierversuche waren vom Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt (AZ 02-17/00 vom 18.05.2000).

4.1.2. Geräte

Begasungsbrutschrank Cellstar; Nunc, Wiesbaden
Biofuge 13, Heraeus Instruments, Gera
Edelstahl-Gewebesiebe, Tissue Grinder Kit, 80 mesh, SIGMA; Deisenhofen
ELISA-Reader EAR 400FT, SLT Labinstrumente Deutschland, Crailsheim
Feinwaage MB BC 100, Sartorius, Göttingen
Finntip Multisteppler, Labsystems, Helsinki, Finnland
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer; Feinoptik, Bad Blankenburg
Gamma-Counter; Wallac, Turku
Kolbenhubpipetten in verschiedenen Größen; Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Jouan CR312; Jouan, Unterhaching
Laminar-Flow-Werkbank; Elektromat, Dresden
Mehrkanalpipetten; Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Jenamed; Carl Zeiss, Jena
Multipipette; Eppendorf, Hamburg
Oditest-Schnelltaster; Kröplin, Schlüchtern
Pipettierhilfe Pipetus Akku, Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt
Präparationsbesteck; Aeskulap, Tuttlingen

Spektrophotometer UV 1202, Shimadzu, Duisburg
Schlittenmikrotom, Jung AG, Heidelberg
Sterilisator, MLW Dentalfabrik, Treffurt
Tischzentrifuge Biofuge 13; Heraeus, Hanau
Waschgerät Columbus; SLT Laborinstruments, Crailsheim
Wasserbad mit Thermostat, Julabo, Seelbach
Zellharvester Unifilter-96; Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim

4.1.3. Verbrauchsmaterialien

Einmalfilter (0,45 µm); Schleicher & Schüll, Dassel
Einmalspitzen (10, 100 und 1000 µl); Eppendorf, Hamburg
Einmalspritzen und -kanülen; Braun-Melsungen, Melsungen
Einmalstangenpipetten in verschiedenen Größen; Greiner, Nürtingen
ELISA-Kit Pharmingen OptEIA zur Interleukin 10-Bestimmung; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Eppendorftubes; Eppendorf, Hamburg
Gewebekulturflaschen in verschiedenen Größen; Greiner, Nürtingen
Gewebekulturplatten 6-Well, 12-Well, 24-Well und 96-Well; Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen (60/15 mm); Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen (100/20 mm); Corning Costar, Bodenheim
Mikrotiterplatten für Zytokin-ELISA (Maxisorb); Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten für Immunglobulin-ELISA; Greiner, Nürtingen
Multistepper Pipet Tips, 1500µl, Sigma, St. Louis, USA
Objektträger und Deckgläser; Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten aus Glas, Rudolf Brand, Wertheim
Polystyrol- (PS-) Röhrchen (14 ml); Greiner, Nürtingen
Polypropylen- (PP-) Röhrchen (50 ml); Greiner, Nürtingen
TopSeal Abdeckfolie; Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim
Zellsiebe; Falcon, Gräfelfing-Locham

4.1.4. Chemikalien

Äther, Hoechst AG, Frankfurt

Bordetella pertussis (hitzeinaktiviert); Chiron Behring, Marburg

BSA (Bovines Serum Albumin); Sigma, Deisenhofen

Concanavalin A (Con A); Amersham, Freiburg

Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM), flüssig, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA

EDTA; Sigma, Deisenhofen

Eosin-Natrium, Laborchemie Apolda, Apolda

Extravidin-Alkalische Phosphatase; Sigma, Deisenhofen

Fetales Kälberserum (FCS); Gibco, Karlsruhe

Glycin; Sigma, Deisenhofen

Hämatoxylin, Merck, Darmstadt

HEPES-Puffer, GIBCO BRL, Gaithersburg, USA

HCl; Roth, Karlsruhe

HCOOH; Sigma, Deisenhofen

Heparin (Liquemin N20000); Roche, Grenzach-Wyhlen

H₂O₂; Roth, Karlsruhe

³H-Thymidin; Amersham-Buchler, Braunschweig

KCl; Roth, Karlsruhe

KH₂PO₄; Roth, Karlsruhe

Komplettes Freundesches Adjuvans (CFA); Sigma, Deisenhofen

Kollagen Typ II; Sigma, Deisenhofen

2-Mercaptoethanol; Gibco, Karlsruhe

Methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA); Sigma, Deisenhofen

MgCl₂; Sigma, Deisenhofen

Mycobacterium tuberculosis (Stamm H37RA); Becton Dickinson, Heidelberg

NaCl; Sigma, Deisenhofen

Na₂CO₃; Roth, Karlsruhe

NaHCO₃; Merck, Darmstadt

Na₂HPO₄; Roth, Karlsruhe

NaH₂PO₄; Sigma, Deisenhofen

NaN₃; Sigma, Deisenhofen

NaOH; Sigma, Deisenhofen

Na₂PO₄ ; Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat; Gibco, Karlsruhe
NH₄Cl; Sigma, Deisenhofen
(NH₄)₂SO₄; Sigma, Deisenhofen
o-Phenylendiamin; Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat, Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin/Glutamin; Gibco, Karlsruhe
Propidiumjodid; Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640 Medium; Gibco, Karlsruhe
Streptavidin-APC; BD Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin-Peroxidase; Dianova, Hamburg
Streptavidin-PE; BD Pharmingen, Heidelberg
Szintillationscocktail Microscint O; Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
TRIS; Sigma, Deisenhofen
Trypanblau; Sigma, Deisenhofen
Tween 20; Sigma, Deisenhofen
Zitronensäure; Sigma, Deisenhofen

4.1.5. Verwendete Kulturmedien, Lösungen und Puffer

4.1.5.1. Lösungen für Zellkultur, -sortierung und -analyse

Komplettes Medium

RPMI 1640 supplementiert mit:
10% (v/v) FCS
2 mM Glutamin
10 mM Hepes
100 U/ml Penicillin
0,1 mg/ml Streptomycin
0,05 mM 2-Mercaptoethanol
1 mM Natriumpyruvat

Spülmedium zur Zellpräparation

DMEM, supplementiert mit
NaHCO₃, 700mg/l

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

8 g NaCl

1,44 g Na₂PO₄ x 2 H₂O

0,2 g KH₂PO₄

0,2 g KCl

in 1 l Aqua bidest. lösen und auf pH 7,4 einstellen

Ammoniumchlorid/TRIS zur Erythrozyten-Lyse

1. 0,83% (w/v) NH₄Cl (7,47g in 900ml H₂O)

2. TRIS (2,059g in 100ml H₂O) auf pH 7,65

3. 9 Teile von 1. + 1 Teil von 2. mischen, auf pH 7,2 einstellen

Türkische Lösung zum Auszählen der Zellen

in 2%iger Essigsäure einige Kristalle Gentianaviolett auflösen, filtrieren und bei 4°C aufbewahren

Trypsinlösung

0,25% Trypsin

0,02% EDTA

in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)

MTT-Lösung

5mg (3-(4,5)-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)

1ml PBS

SDS-Lösung

10g Natriumdodecylsulfat (SDS)

50ml Dimethylformamid (DMFO) lösen

50ml Aqua dest.

Actinomycin-Lösung

1 µg Actinomycin D-Mannitol

1 ml komplettes Medium (RPMI)

Kristallviolett-Lösung

0,1g Kristallviolett
40 ml 20% iges Methanol

angesäuerte Isopropanol-Lösung

96ml Isopropanol
4ml 1n HCL

Griess-Reagenz

2,5% H_3PO_4
1% Sulfonilamid
0,1% N-(1-naphthyl)-ethylendiamindihydrochlorid
ad Aqua bidest.

4.1.5.2. Puffer für ELISA

Beladungspuffer für ELISA

A) Bikarbonatpuffer

0,84 g NaHCO_3 in 100 ml Aqua bidest. lösen

B) Natriumphosphatpuffer

1,48 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und 1,85 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Aqua bidest. lösen

C) Natriumphosphatpuffer

1,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml Aqua bidest. lösen

Waschpuffer für ELISA

0,05% (v/v) Tween 20 gelöst in PBS
Substratpuffer für Peroxidase
2,1 g Zitronensäure
16,2 ml 1 N NaOH
in 84 ml Aqua bidest. lösen

Substratlösung für Peroxidase

2 mg/ml o-Phenylendiamin (oPD) gelöst in Zitratpuffer
vor dem Auftragen Zugabe von 25 $\mu\text{l/ml}$ H_2O_2 (3%)

Substratpuffer für Alkalische Phosphatase

100 ml 0,1M TRIS

20 mg MgCl_2

Substratlösung für Alkalische Phosphatase

2,6 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (pNPP) in Substratpuffer

Stopplösung für die Alkalische Phosphatase

5,3 g Na_2CO_3 auf 100 ml Aqua bidest.

4.1.5.3. Lösungen für Histologie

Entkalkungslösung

25%ige HCl

100%ige HCOOH

70 g AlCl_3

auf 1 l Aqua bidest.

4.1.6. Verwendete Antikörper

anti-CD4 monoklonaler Antikörper GK1.5c (Tierversuch)

anti-Rat IgG (Tierversuch)

4.1.7. Verwendete Therapiesubstanzen

Rolipram (EMD 047089 Lot.2, M: 275,35 g/mol), E. Merck, Darmstadt

Piclamilast (RP73401, M: 381,3 g/mol), Byk-Gulden, Konstanz

4.2. Methoden

4.2.1. Immunisierung und Arthritisinduktion

Zum besseren Zeitverständnis wird im Folgenden der Tag der Arthritisinduktion als Tag 0 (d0) bezeichnet.

Für die Immunisierung wird zunächst eine Lösung des Antigens methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA) mit einer Konzentration von 2 mg/ml mBSA in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Komplettes Freund'sches Adjuvans (CFA) mit einer Konzentration von 1 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA) wurde auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml supplementiert. Die mBSA-Lösung wird in einem gleichen Volumen komplettem Freund'schen Adjuvans suspendiert. Von diesem Ansatz werden 21 Tage vor Arthritisinduktion (d -21) 100 μ l (entspricht 100 μ g mBSA) subkutan in die rechte Flanke jeder Maus gespritzt. Zusätzlich erhalten die Tiere eine intraperitoneale Injektion von 5×10^8 hitzeinaktivierten *Bordetella pertussis*-Keimen. Zur Reimmunisierung („Boosterung“) erfolgt eine Woche (d -14) später die erneute Injektion der Antigen-Adjuvanslösung, dieses Mal subkutan im Bereich der Schwanzwurzel. Zwei Wochen nach der Booster-Immunisierung (d0) erfolgt die Auslösung der Antigen-induzierten Arthritis durch die intraartikuläre Injektion von 25 μ l (entspricht 100 μ g mBSA) einer sterilen mBSA-Lösung mit einer Konzentration von 4 mg/ml mBSA in PBS in das rechte Kniegelenk. Das linke Kniegelenk bleibt unbehandelt.

4.2.2. Beurteilung der Schwere der Arthritis

4.2.2.1. Gelenkschwellung

Durch die Arthritisinduktion nach dem in Abschnitt 4.2.1. beschriebenen Schema kommt es im rechten Kniegelenk zu einer deutlichen Gelenkschwellung, insbesondere in der akuten Phase der AIA. Die Bestimmung der Gelenkschwellung erfolgt unter Verwendung des Oditest-Schnelltesters. Die Differenz aus rechtem (arthritischem) und linkem (normalem) Kniegelenk dient als Maß für die klinische Schwere der Arthritis.

4.2.2.2. Histologie

Unter leichter Ethernarkose werden die Mäuse am Ende des Experimentes durch Karotisschnitt entblutet und durch zervikale Dislokation getötet. Danach erfolgt die Entnahme der Kniegelenke, die dann für mindestens 24 Stunden in 4,5%igem gepufferten Formalin bei Raumtemperatur fixiert werden. Anschließend werden die Gelenke in Entkalkungslösung entkalkt. Über eine aufsteigende Alkoholreihe werden die Gelenke entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die von diesen Präparaten angefertigten mindestens 3 frontalen Schnitte werden auf einen Objektträger überführt, in einer absteigenden

Alkoholreihe entparaffiniert und im Anschluss mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Die Beurteilung der Schnitte hinsichtlich des Schweregrades der histologischen Veränderungen erfolgt durch zwei unabhängige Begutachter ohne Kenntnis der Versuchsgruppen. Zur Bewertung wird das in Tabelle 3 dargestellte Auswerteschema herangezogen.

Die Summe der Punkte für Mesothelveränderungen und Infiltration ergibt als Maß für die Stärke der Entzündung den Synovialisindex. Die Summe aus Knorpelnekrosen und Pannusformation ergibt als Maß für die Stärke der Gelenkdestruktion den Knorpelindex. Der Gesamt-Arthritiscore errechnet sich aus der Summe von Synovialis- und Knorpelindex.

Tabelle 3: Semiquantitatives Scoresystem zur histologischen Bewertung der Schwere der AIA

Punkte Mesothelveränderungen	
0,5	Geringe Abnormitäten, Schwellung, kubische Transformationen einschichtig, herdförmig
1	Herdförmige kubische Transformationen, einschichtig, an mehreren Stellen
1,5	Wie 1, jedoch große Teile der Tunica synovialis oder sämtliche Areale umfassend
2	Kubische Transformationen, mehrreihig, herdförmig
2,5	Wie 2, jedoch große Teile der Tunica synovialis oder sämtliche Areale umfassend, Nekrosen möglich
3	Mehrreihiges Mesothel mit ausgedehnten Nekrosen
Punkte Infiltration	
0,5	Einzelne schütterte, herdförmige Infiltrate von Lymphozyten/Plasmazellen auf die Rezessus beschränkt
1	Herdförmige Infiltrate an mehreren Stellen, aber beschränkt
1,5	Diffuse Infiltrate, beschränkt
2	Herdförmige Infiltrate, ausgedehnt im gesamten Gelenk
2,5	Diffuse Infiltrate, ausgedehnt im gesamten Gelenk
3	Ausgeprägte Infiltrate, auf die Kapsel übergreifend oder mit herdförmiger Aggregation
Punkte Knorpelschädigung	
0,5	Oberflächliche Nekrose in einer Gelenkregion, dieselbe nicht vollständig umfassend
1	Oberflächliche herdförmige Nekrose in mehr als einer Gelenkregion
1,5	Nekrosen in mehr als einer Region oder eine Region vollständig umfassend
2	Nekrosen bis zur Tidemark reichend, herdförmig ausgeprägt
2,5	Nekrosen bis zur Tidemark reichend, in mehr als einer Gelenkregion
3	Ausgedehnte tiefgreifende Nekrosen mindestens bis zur Tidemark, an mehreren Stellen
Punkte Pannusbildung	
0,5	Angedeutete Entwicklung an ein bis zwei Stellen mit geringer Infiltration
1	Entwicklung an ein bis zwei Stellen mit deutlicher Infiltration
1,5	Entwicklung an mehreren Stellen mit deutlicher Infiltration und zungenförmiger Auflagerung auf der Knorpeloberfläche oder zangenförmiger Infiltration an einer Stelle
2	Entwicklung an mehreren Stellen mit zangenförmiger Infiltration oder flaches Überwachsen einer Gelenkfläche
2,5	Deutlich ausgeprägte Entwicklung an mehreren Stellen mit zangenförmiger Infiltration oder zungenförmigem Überwachsen einer oder mehrerer Gelenkflächen
3	Ausbildung an mehr als vier Stellen oder exzessive Ausbildung an zwei Stellen

4.2.3. Messung der zellulären Immunreaktivität in vivo

4.2.3.1. Theoretische Grundlagen

Als Maß für die zelluläre Immunreaktivität kommt die Auslösung einer Immunreaktion vom verzögerten Typ, wie beispielsweise der Tuberkulinreaktion in Frage. Dabei kommt es 48 bis 72 Stunden nach Antigenapplikation in die Haut zu einer Infiltration mit sensibilisierten T-Lymphozyten.

Man kann bei der Antigen-induzierten Arthritis der Maus durch Applikation des Antigens in die Haut des Ohres eine Immunreaktion vom Tuberkulintyp hervorrufen. Diese Reaktion kann durch T-Zell-Transfer übertragen werden. Die verantwortlichen T-Zellen wurden als sogenannte Th/DTH-Zellen beschrieben (Farmer et al., 1986). Es konnte im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis ein Zusammenhang zwischen der Schwellung des Ohres und der Kniegelenksschwellung gezeigt werden (t Hart et al., 1994). Dies macht man sich im Maus-Ohr-Test zur Bestimmung der „delayed-type hyperreactivity“ (DTH) Reaktion als Maß für die zelluläre Immunreaktivität zu Nutze.

4.2.3.2. Durchführung

Zur Abschätzung der Stärke der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion (DTH-Reaktion) wurde den Tieren 7 Tage (d7) nach der Arthritisinduktion unter Etheranästhesie eine Antigenlösung von 5 µg mBSA in 10 µl PBS intrakutan in ein Ohr injiziert. Die Dicke des Ohres wurde vor der Antigenapplikation sowie 24 und 48 Stunden danach in Etheranästhesie gemessen. Die Schwellung als Zeichen der Immunreaktion ergibt sich aus der Differenz der Ohrdicke und dient als Maß für die Stärke der zellulären Immunreaktivität.

4.2.4. Zellpräparationen und Zellkulturen

4.2.4.1. Makrophagen

Nach Ausbluten und Tötung der Versuchstiere in Ethernarkose erfolgte eine Desinfektion durch vollständiges Eintauchen in 70%igen Alkohol. Alle weiteren Arbeitsschritte an den Versuchstieren bzw. den gewonnenen Zellen erfolgten unter „laminar-flow“-Bedingungen.

Das Peritoneum wurde freipräpariert, in die Bauchhöhle wurden 5 ml 4°C kalte PBS mit 5 IE Heparin/ml eingespritzt und der Bauch ca. 30 Sekunden massiert. Der entstandene „Aszites“ wurde abgesaugt, das Peritoneum eröffnet und eine nochmalige Spülung des Bauchraumes mit 3 ml PBS (mit Heparin) vorgenommen, um eine maximale Zellausbeute zu erzielen. Die so gewonnenen Peritonealexsudatzellen wurden in eisgekühlten Zentrifugenröhrchen gesammelt. Während der weiteren Arbeitsschritte ist eine durchgehende Kühlung bis zur Inkubation unerlässlich, da anderenfalls eine Adhärenz der Makrophagen an den Gefäßwänden auftritt.

Zur Reinigung der Zellen erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang, durch Abzentrifugieren der Peritonealexsudatzellen 10 min bei 1000 rpm, Abgießen der Überstände und Resuspension in 5 ml kalter PBS. Die Resuspension der Zellen nach dem Waschvorgang erfolgte in 10 ml komplettem RPMI-Medium bzw. für eine spätere TNF- α -Bestimmung in serumfreiem Makrophagenmedium (SFM). Nach Zählung in Türk'scher Lösung wurde die Zellzahl auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Makrophagen adhären an Plastikoberflächen. Diese Eigenschaft wurde für die Isolation der Makrophagen aus den Peritonealexsudatzellen genutzt: nach zweistündiger Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ in 24-Well-Gewebekulturplatten mit 1 ml Zellsuspension je Well wurden die Platten vorsichtig geschüttelt, die Überstände abgesaugt, die Wells drei Mal mit 37°C warmem, serumfreien Medium gespült und anschließend wieder mit 1 ml komplettem RPMI-1640-Medium bzw. SFM pro Well aufgefüllt. Die auf diese Weise erhaltenen adhärenen Zellen sind morphologisch und funktionell zu >90% Makrophagen (Gifford and Lohmann-Matthes, 1987; Nicaise et al., 1993).

Während der anschließenden Inkubation der Makrophagen erfolgte eine Kostimulation mit 1 μ g LPS/ml und 10 U IFN- γ /ml bzw. keine Stimulation für eine unstimulierte Kontrollgruppe. Nach 25 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Überstände abgesaugt und zum Entfernen von Zellresten 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Lagerung der aliquotierten Überstände bis zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen erfolgte bei -70°C.

4.2.4.2. Milzlymphozyten

Nach Tötung der Versuchstiere sowie ggf. Makrophagengewinnung erfolgte eine Entnahme der Milzen unter sterilen Bedingungen. Im Anschluss wurden die Organe unter Verwendung eines sterilen groben Edelstahlgewebesiebes zu einer Einzelzellsuspension aufbereitet. Nach dem Lysieren der Erythrozyten mit Ammoniumchlorid/TRIS-Lösung wurden die Zellen zweimal gewaschen, gezählt und auf 1×10^6 Zellen/ml komplettes RPMI-Medium eingestellt.

Die Kultur erfolgte in 96-Well-Platten für den Proliferationsassay mit jeweils 200 μ l Zellsuspension/Well bzw. 24-Well-Platten zur Überstandsgewinnung mit jeweils 1 ml Zellsuspension/Well. Die Stimulation erfolgte mit dem Antigen mBSA (25 μ g/ml Zellsuspension) bzw. mit dem Mitogen ConA (5 μ g/ml Zellsuspension). Den Wells wurden außerdem unterschiedliche Konzentrationen der Testsubstanz Rolipram hinzugefügt. Anschließend wurden die Milzzellkulturen im Brutschrank für 72 Stunden inkubiert.

Zur Überstandsgewinnung wurden die Zellen nach Ablauf dieses Zeitraumes abzentrifugiert und der Überstand aliquotiert und bis zur Messung bei -70°C aufbewahrt.

4.2.4.3. Synoviozyten

Das Präparieren des Synovialgewebes aus arthritischen Rattenkniegelenken erfolgte unter sterilen Bedingungen. Das gewonnene Synovialgewebe wurde in PBS zerschnitten und für 30 min mit 0,1% Trypsin in PBS bei 37°C inkubiert. Durch Abzentrifugieren für 10min bei 1200 rpm wurde die Trypsinlösung von den Zellen separiert und verworfen. Im Anschluss erfolgte ein Inkubationsschritt für 2h mit 0,1% Kollagenase in komplettem DMEM bei 37°C . Nach Entfernung verbliebener Gewebereste mittels Stahlsieb und zweimaligem Waschvorgang in Medium wurden die Zellen in 10ml komplettem DMEM resuspendiert und in eine 50ml-Kulturflasche ausgesät. Bei 37°C und 5% CO_2 , 95% relativer Luftfeuchte und täglichem Mediumwechsel erfolgte die Kultur der Zellen, bis sie einen am Boden der Kulturflasche konfluenten Zellrasen gebildet hatten.

Zur weiteren Kulturpassage wurden die Zellen nach PBS-Spülung mit Trypsinlösung vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und nach Resuspension in DMEM zentrifugiert und gewaschen. Nach erneuter Aufnahme in komplettem DMEM erfolgte die Aussaat der Synoviozyten in 24-Well-Platten (10^5 Zellen/Well). Es erfolgte jeweils eine Stimulation mit 10 μ g/ml LPS und 50 U/ml IFN- γ , nach 24h wurden die konfluenten Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen, es folgte die Inkubation mit der Testsubstanz Rolipram in verschiedenen Konzentrationen für weitere 24h. Im Anschluss wurden die Überstände geerntet, abzentrifugiert, aliquotiert und bis zur Messung bei -70°C aufbewahrt.

4.2.5. Lymphozytenproliferationstest

Die Beeinflussung des Proliferationsverhaltens der Milz-Lymphozyten kann anhand der proliferativen Reaktion auf eine Stimulation mit dem spezifischen Antigen mBSA oder mit

dem Mitogen ConA erfolgen. Das Messprinzip beruht auf dem Einbau von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin in die DNA der sich teilenden Zellen.

Für den Lymphozyten-Proliferationsassay wurden die nach oben beschriebenen Schema gewonnenen Milzlymphozyten auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in 96-Well-Gewebekulturplatten ausgesät. Den Wells wurden zur Stimulation der Lymphozyten unterschiedliche Konzentrationen des Antigenes mBSA (1; 5; 10 $\mu\text{g/ml}$) bzw. des Mitogens ConA (1,25; 2,5; 5 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt. Nach drei Tagen wurden bei den mitogenstimulierten Zellen und nach 5 Tagen bei den antigenstimulierten Zellen 0,5 μCi ^3H -Thymidin hinzugegeben und über weitere 18h inkubiert.

Der Überstand der Gewebekulturgefäße wurde anschließend mit dem Zellharvester auf Unifilter-96-Well GF/C- Platten geerntet. Diese Platten wurden anschließend getrocknet, der Boden mit Folie versiegelt, pro Well 30 μl des Szintillationscocktail Microscint O eingefüllt und mit einer Abdeckfolie TopSeal versehen. Die Radioaktivität wurde mit dem Szintillationszähler TopCount bestimmt.

4.2.6. Zytokinbestimmung im ELISA

Die Messung der Zytokinproduktion in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Hierzu wurden 96-Well-Platten (Nunc Maxisorb) mit den in Tabelle 4 angegebenen Primärantikörpern im entsprechenden Beladungspuffer über Nacht bei 4°C beladen

(100 $\mu\text{l/Well}$). Anschließend wurden die Platten gewaschen und die freie

Proteinbindungskapazität durch Inkubation der Wells mit 300 μl PBS/2% (w/v) BSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Im nächsten Schritt erfolgt das Auftragen der Proben in die vorbereiteten Kavitäten (100 $\mu\text{l/Well}$). Nach einer Inkubationsphase über Nacht bei 4°C wurden die Platten gewaschen, danach erfolgte die Detektion durch die in Tabelle 4 genannten biotinylierten Sekundärantikörpern (100 $\mu\text{l/Well}$) für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde in jedes Well der erneut gewaschenen Platte 100 μl Streptavidin-Peroxidase (2 $\mu\text{g/ml}$ in PBS/1% (w/v) BSA) gegeben und für weitere 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Platten erfolgte die Entwicklung des ELISA mit dem Substrat ortho-Phenylendiamin in Zitratpuffer (100 $\mu\text{l/Well}$). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2n H_2SO_4 abgestoppt und die Extinktion im ELISA-Reader gemessen (492 nm/620 nm). Als Standard diente eine Verdünnungsreihe des jeweiligen rekombinanten Zytokins mit der in Tabelle 4 angegebenen Anfangskonzentration. Interleukin 10 wurde mit dem kommerziell erhältlichen OptEIA-Kit (Pharmingen) entsprechend des beigefügten Protokolls gemessen.

Tabelle 4: Übersicht über die für die Zytokin-ELISA verwendeten Antikörper, Puffer und Standardkonzentrationen. Der in Klammern gefasste Buchstabe nach der Konzentration des Primärantikörpers bezeichnet den jeweiligen Beladungspuffer; siehe 4.1.5.2

Zytokin	Primär-antikörper	Konzentration	Sekundär-antikörper	Konzentration	Standard
IL-1β	MAB401	2 $\mu\text{g/ml}$ (A)	BAF401	0,05 $\mu\text{g/ml}$	1000 pg/ml
IL-2	JES6-1A12	1 $\mu\text{g/ml}$ (C)	JES6-5H4	0,05 $\mu\text{g/ml}$	2000 pg/ml
IL-4	BVD4-1D11	2 $\mu\text{g/ml}$ (A)	BVD6-24G2	1 $\mu\text{g/ml}$	200 pg/ml
IL-6	MP5-20F3	2 $\mu\text{g/ml}$ (A)	MP5-32C11	0,25 ng/ml	10000 pg/ml
IFN-γ	R4-6A2	1 $\mu\text{g/ml}$ (C)	XMG1.2	0,5 $\mu\text{g/ml}$	3000 pg/ml
TNF-α	G281-2626	6 $\mu\text{g/ml}$ (B)	MP6-XT3	0,5 $\mu\text{g/ml}$	2500 pg/ml

4.2.7. Zytokinbestimmung im Bioassay

4.2.7.1. Interleukin-6-Bioassay

Zum Nachweis von Interleukin 6 (IL-6) wurde ein Bioassay mit der IL-6-sensitiven transformierten Maus-B9-Zelllinie verwendet. Diese Zelllinie benötigt IL-6 als essentiellen Wachstumsfaktor, ihre Proliferation ist in einem bestimmten Bereich (bis zum maximalen Zellwachstum) direkt proportional dem IL-6-Gehalt der Probe. Als Negativkontrolle diente Medium, als Positivkontrolle ein rekombinantes IL-6, das auch zur Standardisierung der Ergebnisse verwendet wurde.

Zur Kultivierung der Zellen wurden jeweils ca. 5×10^6 Zellen in 5 ml B9-Medium sowie 0,5 ml Kulturüberstand mononukleärer Zellen (MNC) resuspendiert und für zwei Tage im Brutschrank kultiviert. Alle 48 h wurden die Zellen passagiert und in 10 ml B9-Medium mit einer Zellzahl von 3×10^4 Zellen/ml unter Zugabe von 0,5 ml MNC-Überstand resuspendiert. Am Vortag der Testung erfolgte bei der Passagierung die Einstellung der Zellzahl auf 10^5 Zellen/ml, ohne MNC-Überstand.

Zur Testung fanden 96-Well-Flachboden-Gewebekulturplatten Verwendung. Die Ausverdünnung der Proben erfolgte als Doppelbestimmung: Vorlage von 50 μl B9-Medium in jedes Well, Zugabe von je 50 μl Probe in jedes Ausgangswell, Verdünnung in Schritten von 1:2 über 8 Stufen. Zugabe von 50 μl B9-Zellsuspension pro Well mit 5×10^4 Zellen/ml. Nach 68 Stunden Inkubation (37°C, 5% CO₂) erfolgte die Zugabe 10 μl (50 μg) MTT in jedes Well, danach eine nochmalige vierstündige Inkubation. Dann erfolgte die Zugabe von 100 μl SDS-Lösung pro Well sowie nach nochmaliger vierstündiger Inkubation bei 37°C die Messung der Extinktion im ELISA-Reader bei 570 nm (Referenz 690 nm).

Die gemessenen und leerwertkorrigierten Extinktionen wurden mit der Methode der kleinsten

Quadrate interpoliert und die 50%-Aktivität der Probe bestimmt. Durch Verwendung der Standardverdünnungsreihe mit rekombinantem IL-6 in jeder Testreihe wurde die Berechnung des absoluten Gehaltes an Interleukin 6 möglich.

4.2.7.2. *TNF-Bioassay*

Zur Bestimmung des TNF- α -Gehalts der Kulturüberstände wurde der L929-Zytotoxizitätstest verwendet, der den biologisch aktiven TNF- α erfaßt und nicht durch andere Zytokine (IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, INF- γ) bzw. LPS oder Prostaglandin E2 beeinflusst wird (Branch et al., 1991; Tomkins et al., 1992).

Zur Kultivierung der L929-Zellen (Subklon C5F6) fand komplettes RPMI-1640-Medium Verwendung. Die Kontrolle der Testfähigkeit der Zellen erfolgt im Phasenkontrastmikroskop und war erreicht, wenn etwa die Hälfte der Zellen abgerundet erschien und die andere Hälfte die ausgebreitete Fibroblastenmorphologie zeigte.

Zunächst erfolgte die Trypsinierung der Zellen, da es sich bei den L929- Zellen um eine adhärente Mausfibroblastenlinie handelt, mit 6 ml Trypsin/EDTA-Lösung. Die Beendigung der Trypsin-Wirkung erfolgte mit 6 ml FCS. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (8 min bei 1200 rpm), in 25 ml komplettem Medium resuspendiert und die Zellzahl wurde nach Zählung in Türk'scher Lösung auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt.

Zur Testung wurden 96-Well-Flachboden-Gewebekulturplatten verwendet. Die Titrierung der Proben erfolgte jeweils als Doppelbestimmung über 8 bzw. 16 Stufen. Es wurde jeweils eine Negativkontrolle (serumfreies Makrophagenmedium) sowie eine Positivkontrolle mit 250 U/ml rekombinantem TNF- α mitgeführt. Zur Standardisierung der Ergebnisse diente eine Verdünnungsreihe dieses rTNF- α . Nach Vorlage von 50 μ l komplettem RPMI-1640-Medium und Zugabe von je 50 μ l Probe bzw. Standard entsprechend der Verdünnungsreihen wurden 100 μ l der eingestellten Zellsuspension pro Well hinzugefügt. Um die Sensitivität der Zellen auf TNF- α zu erhöhen, wurden außerdem 50 μ l Actinomycin D-Mannitol je Well hinzugefügt. Nach 20 Stunden Inkubation wurden die Überstände entfernt und die lebenden L929-Zellen zur Quantifizierung mit 50 μ l Kristallviolett je Well für 15 min bei Raumtemperatur angefärbt. Nach mehrmaligem gründlichen Spülen mit warmer PBS wurden die Zellen mittels Zugabe von 100 μ l Isopropanol lysiert. Die Messung der Extinktion erfolgte mittels ELISA-Reader bei 570 nm (Referenz 690 nm). Auf Grundlage der in einem weiten Bereich bestehenden umgekehrten Proportionalität zwischen TNF- α -Gehalt und der Extinktion erfolgte eine lineare Interpolation der Messwerte sowie analog dem IL-6-Test die Berechnung der TNF- α -Konzentration aus der mitgeführten Standardkurve.

4.2.8. NO-Test

Die induzierbare intrazelluläre Stickoxid-Synthase NOS (nitric oxide synthase) produziert in Abhängigkeit vom Aktivitätszustand der Zellen NO, was in Lösung zu HNO_2 wird, was wiederum in H^+ und NO^{2-} dissoziiert. Nitrit (NO^{2-}) kann durch die sogenannte Griess-Reaktion nachgewiesen werden.

Als Indikatorlösung diente Griess-Reagens, als Negativkontrolle wurde Medium verwendet, zur Standardisierung der ermittelten Werte und als Positivkontrolle diente 1 mM Natriumnitrit.

Zur Bestimmung des Nitritgehaltes wurden je 100 μl der zu messenden Probe in ein Well einer 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte gegeben und je 100 μl Griess-Reagens zugesetzt. Nach 10 min. bei Raumtemperatur (Abdunkeln) wurde die Extinktion bei 570 nm (Referenz 690 nm) mit einem ELISA-Reader gemessen.

Die Berechnung des Nitritgehaltes erfolgte über die Mittelung der leerwertkorrigierten Einzelextinktionswerte aus dem Vergleich mit der Standardverdünnungskurve.

4.2.9. Statistische Auswertung

Die Prüfung der Messergebnisse aus den Therapiestudien der Arthritisscores auf statistisch signifikante Gruppenunterschiede erfolgte mit dem parameterfreien U-Test nach Mann und Whitney. Die angegebenen Daten zeigen den Mittelwert \pm den Standardfehler vom Mittelwert (standard error of the mean, SEM). Die Signifikanz wurde für folgende p-Werte definiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Signifikanz

Signifikanz	p-Wert	Abb.
nicht signifikant (ns)	$p > 0,1$	
bedingt signifikant (ms)	$p \leq 0,1$	(*)
signifikant (s)	$p \leq 0,05$	*
sehr signifikant (ss)	$p \leq 0,01$	**
extrem signifikant (es)	$p \leq 0,001$	***

Der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient (r_s) diente zur Bestimmung von Zusammenhängen zwischen den Parametern zur Beurteilung der immunologischen Veränderungen. Die Signifikanz der Korrelation für die verschiedenen Parameter wurde für $p \leq 0,05$ (einseitig) definiert.

Für die Berechnungen wurde das Programm InStat 3.0b for Macintosh (Graphpad Software, Inc., San Diego) sowie SPSS 11.0.4. for Macintosh (SPSS Inc., Chicago) eingesetzt.

Die Darstellung der signifikanten Unterschiede erfolgt in den Abbildungen mit Symbolen oder im Text.

5. Ergebnisse

5.1. Therapiestudien

5.1.1. Design und Beurteilung der Therapiestudien

Zunächst soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine therapeutische Wirksamkeit der Phosphodiesterase-Inhibitoren im Modell der AIA nachweisbar ist.

Die Therapiestudien wurden an weiblichen C57BL/6-Mäusen durchgeführt, eine Therapiegruppe bestand aus jeweils 10 Tieren. Die Immunisierung erfolgte nach dem o.g. Schema 21 bzw. 14 Tage vor Arthritisinduktion. Die Phosphodiesterase-Inhibitoren Rolipram bzw. RP73401 (Piclamilast) wurden jeweils in Polyethylenglycol gelöst und täglich intraperitoneal per injectionem ab Tag 0 verabreicht. In jeder Studie wurde eine Gruppe als Kontrolle mit Polyethylenglycol als Vehicelsubstanz behandelt.

Zunächst wurde mit einer Dosisfindungsstudie begonnen, während der jeweils eine Gruppe von 10 weiblichen C57BL/6-Mäusen mit Rolipram in einer Konzentration von 10 bzw. 2,5 mg/kg Körpergewicht) behandelt wurden. Außerdem sollte geprüft werden, ob ein präventiver Therapieansatz Erfolg verspricht. Dazu wurden einer weiteren Gruppe von 10 Mäusen 10mg/kg Körpergewicht Rolipram bereits ab dem 10. Tag vor Arthritisinduktion verabreicht. In einer weiteren Serie wurde die bereits von Nissler et al. (2004) gezeigte Wirksamkeit einer Behandlung der AIA der Maus mit dem monoklonalen anti-CD4-Antikörper GK1.5 nachvollzogen und die Frage untersucht, ob ein additiver Effekt der Therapie mit einem PhosphodiesteraseIV-Inhibitor und dem anti-CD4-Antikörper zu beobachten ist. Dazu wurden einer Gruppe von 10 C57BL/6-Mäusen an den Tagen 1, 2, 3, 5, 7 und 14 je 50µg des Antikörpers GK1.5 i.p. verabreicht, einer weiteren Gruppe zusätzlich 10mg Rolipram/kg Körpergewicht. Der Vehicelgruppe wurden Polyethylenglykol sowie eine Ratten-Immunglobulin-G-Präparation verabreicht, um unspezifische Wirkungen der Rattenantikörper im murinen System auszuschließen.

Schließlich erfolgte in einer weiteren Studie der Vergleich der Wirksamkeit des spezifischeren PhosphodiesteraseIV-Inhibitors Piclamilast (RP73401) mit Rolipram in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht sowie der Kombination von Rolipram 10mg/kg Körpergewicht mit dem anti-CD4-Antikörper GK1.5.

Aufgrund der vorbeschriebenen stärkeren Wirksamkeit von Piclamilast gegenüber Rolipram (Bundschuh et al., 2001; Souness et al., 1996, 1997) wurde für die Therapie eine Konzentration von 2,5 mg/kg Körpergewicht gewählt.

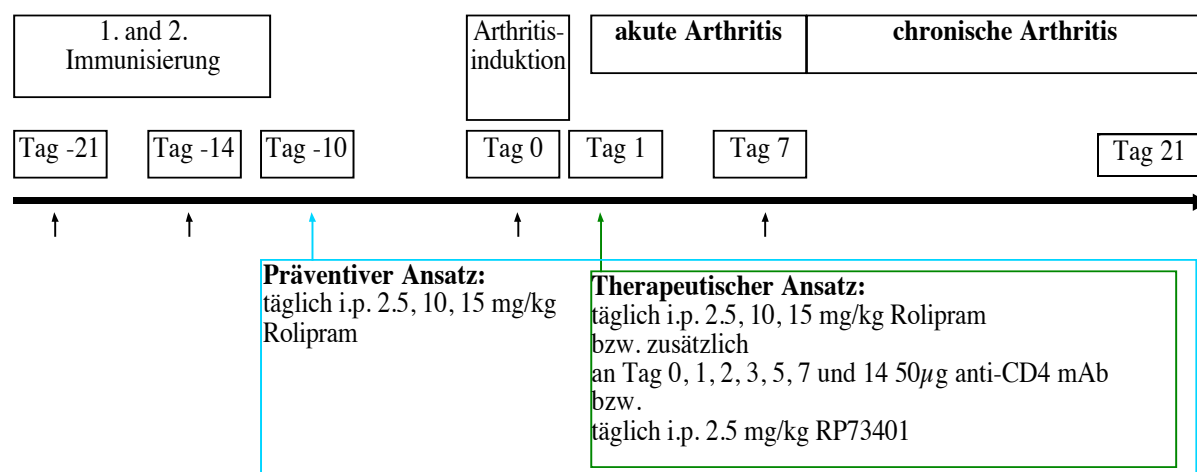


Abb.2: Design der Therapiestudien am Modell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus: Ablaufplan

Bei der RA des Menschen gelten nach den Richtlinien der American Rheumatism Association seit 1988 das Vorhandensein verschiedener diagnostischer Kriterien als definierend für das Vorliegen der Erkrankung. Entscheidend ist die Ausprägung einer meist symmetrischen Arthritis in drei oder mehr Gelenkbereichen, die klinisch durch eine Gelenkschwellung, einen Gelenkerguss und Schmerzhaftigkeit gekennzeichnet ist. Im Modell der AIA der Maus ist insbesondere die Kniegelenksschwellung ein entscheidender klinischer Parameter zur Erfassung der Erkrankungsaktivität. Als weitere objektive Möglichkeit der Überprüfung des Therapieerfolges diene die histologische Bewertung der Gelenkschnitte in Form des Arthritiscores, der semiquantitativ mesotheliale Veränderungen und zelluläres Infiltrat (Entzündung) sowie Knorpelschädigung und Pannusbildung (Knorpelindex) bewertet. Daraus ergibt sich der Gesamtarthritisindex als Maß für den Schweregrad der Arthritis im betroffenen Gelenk. Entsprechend der Studiendauer von 21 Tagen nach Arthritisinduktion fällt das Studienende und damit die histologische Aufarbeitung der Kniegelenke in die chronische Phase der AIA. Die T-Zell-Aktivierung konnte durch den Ohr-Test beurteilt werden, in dem durch Injektion des Antigens in das Ohr der Maus eine Immunreaktion vom verzögerten Typ (DTH, delayed-type hyperreactivity) ausgelöst wird (modifiziert nach Farmer et al. (1986)).

5.1.2. Beeinflussung der Gelenkschwellung

Die Knieschwellung als klinischer Parameter für den Verlauf der Arthritisaktivität zeigte für die ab dem Tag der Arthritisinduktion mit 10mg/kg Körpergewicht Rolipram therapierten Tiere eine deutliche Verringerung im Verlauf der akuten Phase und ein insgesamt signifikant niedrigeres Schwellungsniveau in der chronischen Phase. Eine Konzentration von 2,5mg/kg Körpergewicht hatte einen sichtbaren Einfluss auf den Aktivitätsverlauf der Arthritis im Vergleich zur Vehikelgruppe, der jedoch noch keine Signifikanz erreichte. Somit ist die klinische Wirksamkeit für eine Konzentration von 2,5mg/kg Körpergewicht nicht als ausreichend zu bezeichnen, so dass für weitere Studien eine Dosis entsprechend 10mg/kg Körpergewicht Rolipram eingesetzt wurde, bei der ein signifikanter klinischer Effekt nachzuweisen war.

Für den präventiven Therapieansatz – eine tägliche Therapie mit 10mg/kg Körpergewicht, beginnend mit Tag 14 vor Arthritisinduktion – konnte neben der schon beschriebenen Hemmung der Gelenksschwellung in der späten akuten und der chronischen Phase eine fast vollständige Inhibition des Schwellungsmaximums am Tag nach der Arthritisinduktion beobachtet werden (Abb.3).

Wie bereits von Nissler et al. beobachtet, ließ sich eine Einschränkung der arthritischen Aktivität durch Verabreichung des anti-CD4-Antikörpers GK1.5 sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase der AIA darstellen (Nissler et al., 2004). Bei Therapie mit Rolipram einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht und zusätzlich mit dem anti-CD4-Antikörper konnte eine additive Wirkung beobachtet werden. Dieser additive Effekt war in einer Studie signifikant (Abb.4), in einer anderen Studie zeigte sich ein deutlicher Trend.

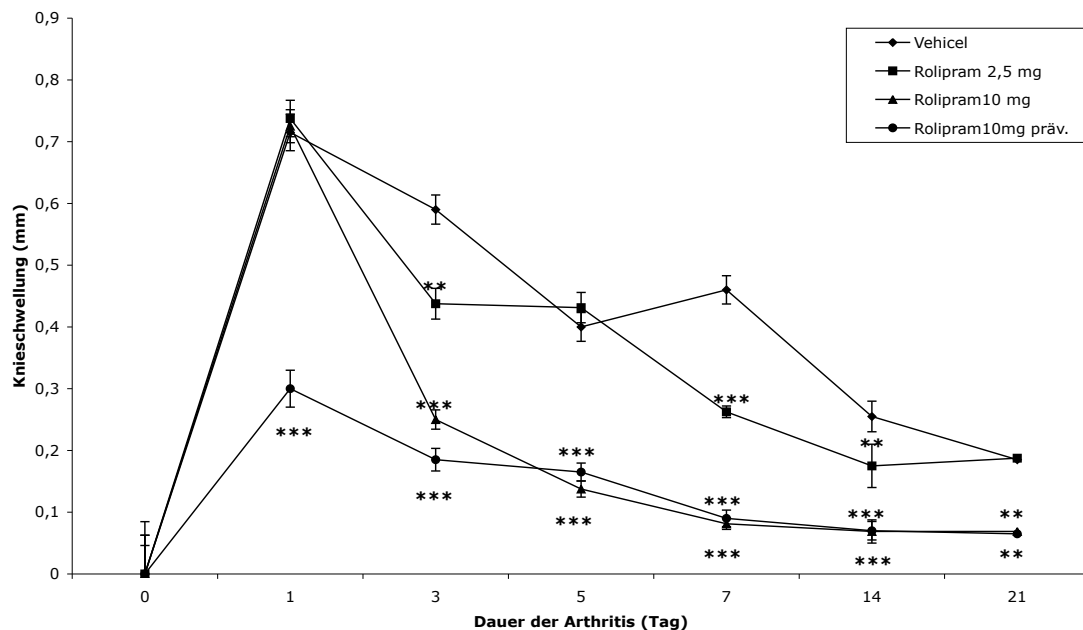


Abb.3: Verlauf der Kniegelenkschwellungen bei C57BL/6-Mäusen (n=10, Mittelwert \pm Standardfehler, *** p<0,001, **p<0,01, * p<0,05); Vehicle: Kontrollgruppe ab d0 mit PEG behandelte Arthritistiere, Rolipram 2,5mg: ab d0 mit Rolipram 2,5mg/kg Körpergewicht therapierte Arthritistiere, Rolipram 10mg: ab d0 mit Rolipram 10mg/kg Körpergewicht therapierte Arthritistiere, Rolipram 10mg prev.: mit Rolipram 10mg/kg Körpergewicht ab Tag 14 vor Arthritisinduktion therapierte Arthritistiere; Gruppenstärke n=10; Signifikanzberechnung: Therapiegruppen gegen Vehiclegruppe

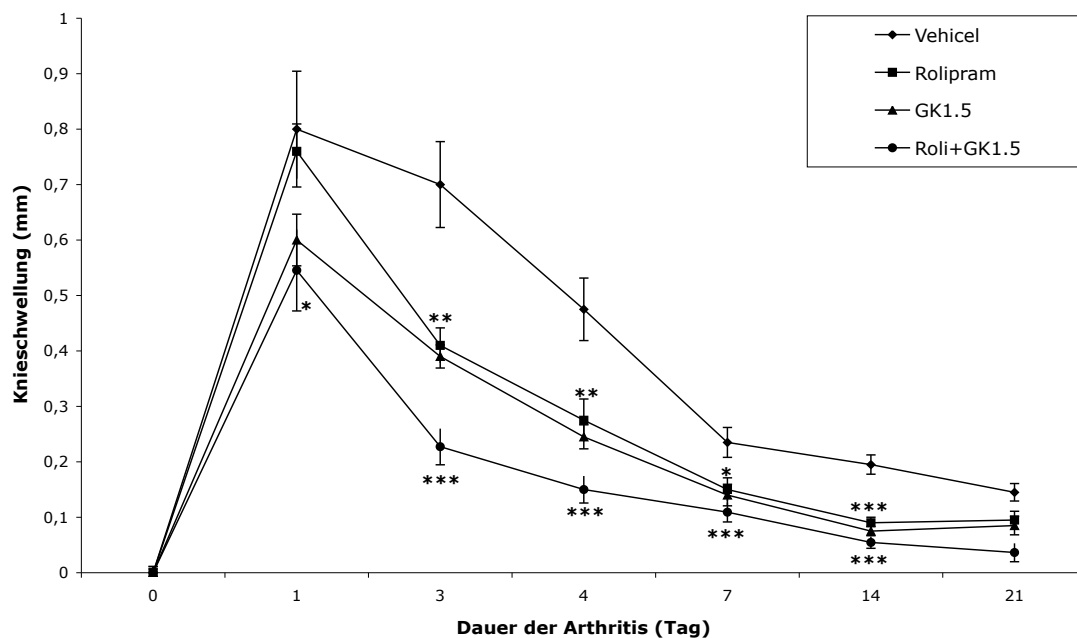


Abb.4: Verlauf der Kniegelenkschwellungen bei C57BL/6-Mäusen (n=10, Mittelwert \pm Standardfehler, *** p<0,001, **p<0,01, * p<0,05); Vehicle: Kontrollgruppe mit Arthritis, Behandlung mit NaCl und Ratten-Immunglobulin ab d0, Rolipram: mit Rolipram 10mg/kg Körpergewicht ab d0 therapierte Arthritistiere, GK1.5: mit dem Antikörper GK1.5 ab d0 therapierte Arthritistiere, Roli+GK1.5: mit Rolipram 10mg/kg Körpergewicht und dem Antikörper GK 1.5 ab d0 therapierte Arthritistiere; Gruppenstärke jeweils n=10; Signifikanzberechnung: Therapiegruppen gegen Vehiclegruppe

Aufgrund der vorbeschriebenen stärkeren Wirksamkeit von Piclamilast (RP73401) gegenüber Rolipram wurde diese Substanz mit einer Konzentration von 2,5mg/kg KG in einer abschließenden tierexperimentellen Serie eingesetzt. Piclamilast führte dabei zu einer erheblichen Reduktion der Kniegelenksschwellung in der akuten wie chronischen Phase. Es zeigte sich jedoch für die eingesetzte Wirkstoffkonzentration eine signifikant schwächere Wirksamkeit als diejenige von 10mg Rolipram /kg KG (Abb.5).

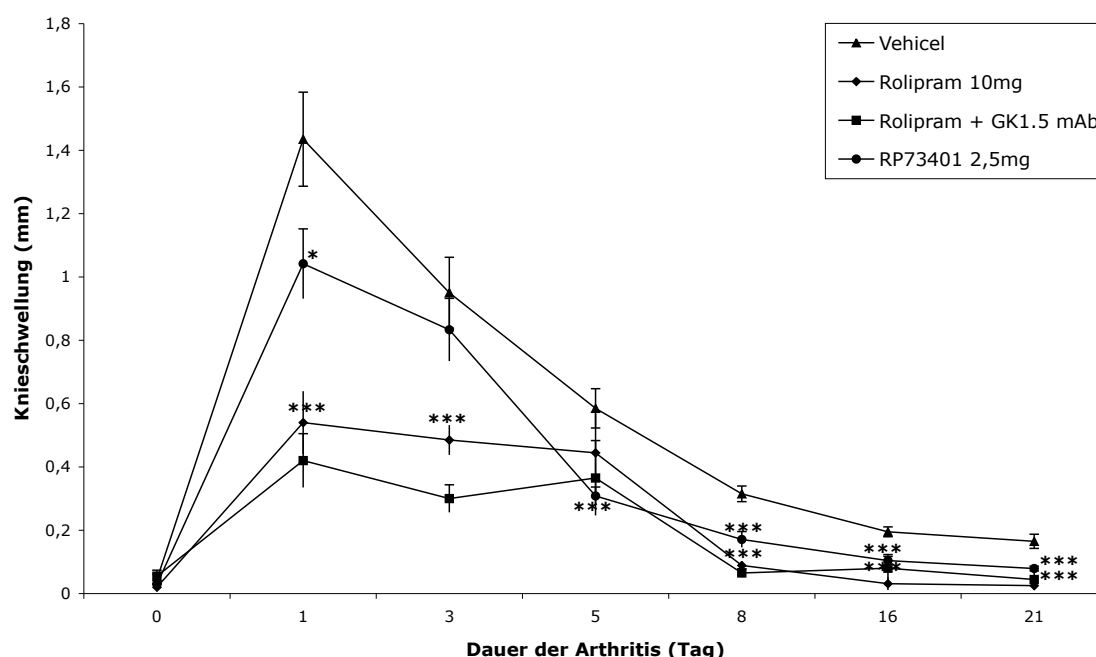


Abb.5: Verlauf der Kniegelenksschwellungen bei C57BL/6-Mäusen (n=10, Mittelwert \pm Standardfehler, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$); Vehicel: Kontrollgruppe mit Arthritis, Behandlung mit Polyethylenglykol ab d0, Rolipram 10mg: mit Rolipram 10mg/kg Körpergewicht ab d0 therapierte Arthritistiere, Rolipram+GK1.5: mit Rolipram 10mg/kg Körpergewicht und dem Antikörper GK 1.5 ab d0 therapierte Arthritistiere, RP73401: mit dem Phosphodiesterase-Inhibitor RP73401 (Piclamilast) 2,5 mg/kg Körpergewicht ab d0 therapierte Arthritistiere; Gruppenstärke n=10; Signifikanzberechnung: Therapiegruppe gegen Vehicelgruppe

5.1.3. Beeinflussung der T-Zell-Aktivität in vivo

Bereits Rolipram in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht bzw. eine Therapie mit dem anti-CD4-Antikörpers GK1.5 allein zeigte jeweils eine signifikant geringer ausgeprägte Immunreaktion vom verzögerten Typ (DTH-Reaktion) gegenüber der Vehicelgruppe, die mit Natriumchlorid und einem Ratten-IgG-Gemisch behandelt wurde. Bei kombinierter Therapie mit Rolipram und dem anti-CD4-Antikörper GK1.5 ließ sich ein Trend zur Addition der

Effekte der Einzelsubstanzen feststellen, der jedoch keine Signifikanz gegenüber den Einzelbehandlungen aufwies (Abb.6).

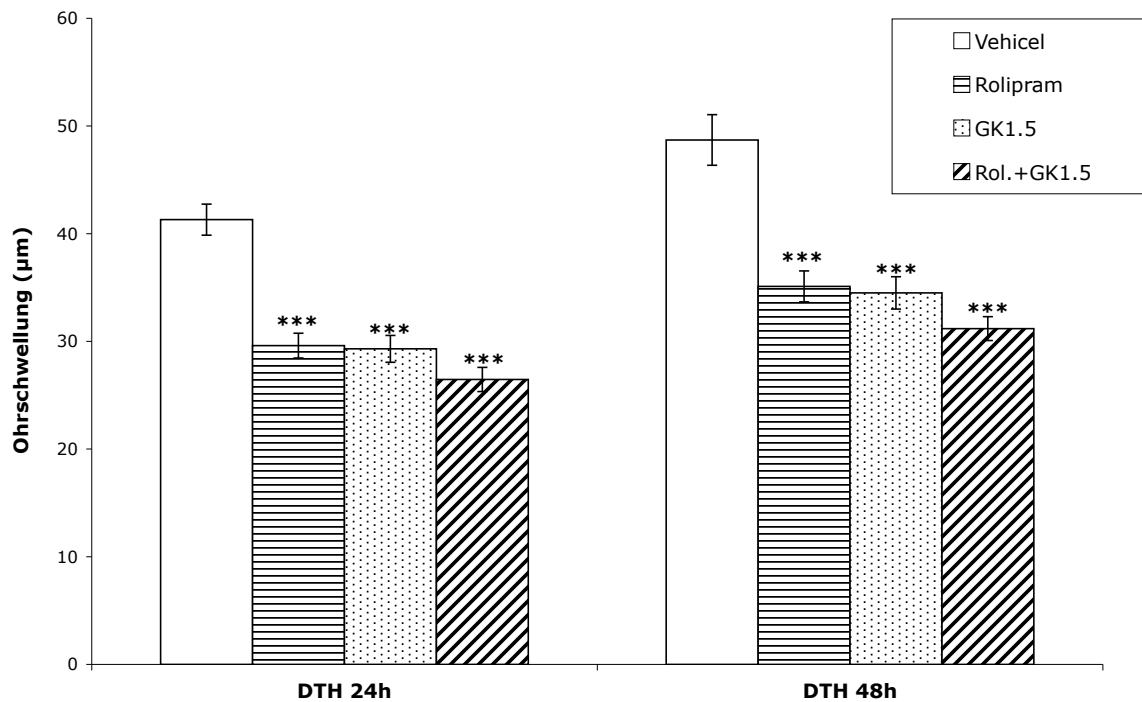


Abb.6: DTH-Reaktion bei C57BL/6-Mäusen (n=10, Mittelwerte±Standardfehler, *** p<0,001, jeweils getestet Therapiegruppe gegen Kontrollgruppe); Vehicel: Kontrollgruppe mit Arthritis, Behandlung mit NaCl und Ratten-Immunglobulin, Rolipram: mit Rolipram 10mg/kg Körpergewicht therapierte Arthritistiere, GK1.5: mit dem Antikörper GK1.5 therapierte Arthritistiere, Roli+GK1.5: mit Rolipram 10mg/kg Körpergewicht und dem Antikörper GK 1.5 therapierte Arthritistiere; Gruppenstärke n=10

Die Therapie mit dem selektiveren Phosphodiesterase IV-Inhibitor RP73401 (Piclamilast) in einer Konzentration von 2,5mg/kg Körpergewicht hatte zwar eine gegenüber der Vehicelgruppe (Therapie mit Polyethylenglykol) schwächer ausgeprägte DTH-Reaktion zur Folge, diese Abschwächung lag jedoch deutlich unter dem Effekt von 10mg/kg Körpergewicht Rolipram (Abb.7).

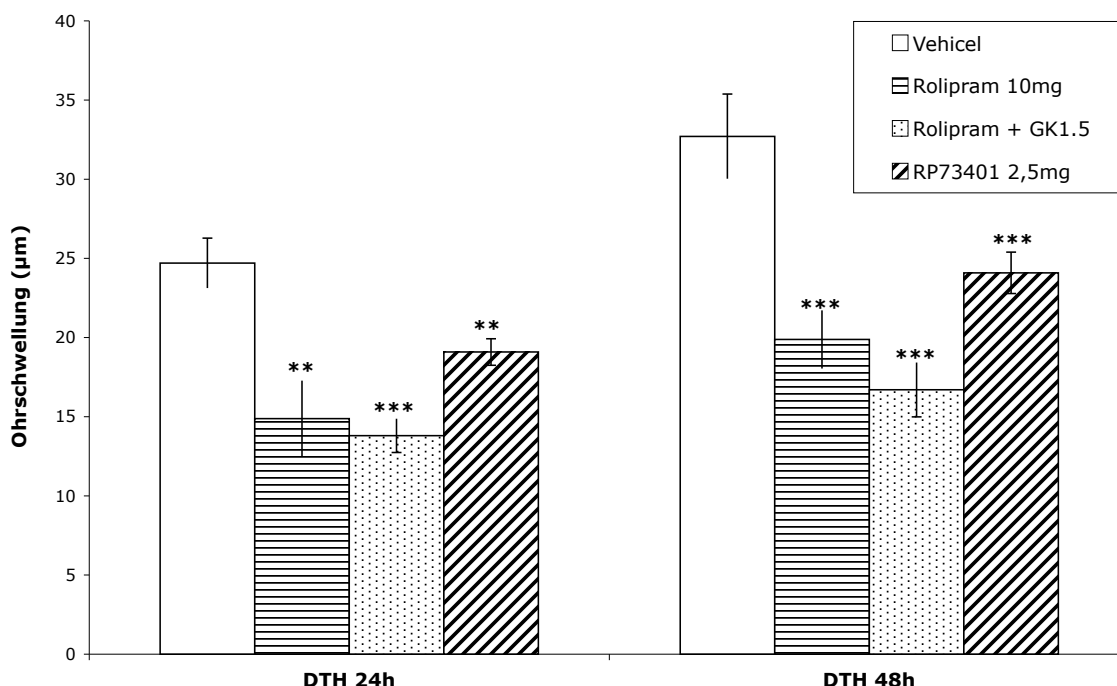


Abb.7: DTH-Reaktion bei C57BL/6-Mäusen (n=10, Mittelwerte±Standardfehler, *** p<0,001, ** p<0,01, jeweils getestet Therapiegruppe gegen Kontrollgruppe); Vehicel: Kontrollgruppe mit Arthritis, Behandlung mit Polyethylenglykol, Rolipram 10mg: mit Rolipram 10mg/kg Körpergewicht therapierte Arthritistiere, Rolipram+GK1.5: mit Rolipram 10mg/ kg Körpergewicht und dem Antikörper GK 1.5 therapierte Arthritistiere, RP73401: mit RP73401 (Piclamilast) 2,5 mg/kg Körpergewicht therapierte Arthritistiere; Gruppenstärke n=10

5.1.4. Beeinflussung der Entzündung und Gelenkdestruktion

Die klinischen Beobachtungen während der Therapiestudien konnten weitgehend durch die histologischen Parameter bestätigt werden.

Im Rahmen der Dosisfindungsstudie zeigte sich für die täglich mit Rolipram in Konzentrationen von 2,5mg bzw. 10 mg/kg Körpergewicht, beginnend mit dem Tag der Arthritisauslösung therapierte Gruppe eine signifikante Verringerung der Entzündungsreaktion (Mesothelabnormitäten und zelluläres Infiltrat) ebenso wie eine geringere Destruktion (Knorpelschädigung und Pannusbildung) gegenüber der Kontrollgruppe.

Ebenso konnte für die Präventivgruppe, der bereits ab 14 Tage vor Arthritisauslösung täglich Rolipram einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht verabreicht wurde, gezeigt werden, dass eine signifikante Verringerung der histologischen Arthritismerkmale eingetreten

ist. Dabei unterscheiden sich die Werte für Synovialis- und Knorpelindex jedoch nicht von der ab dem Tag der Arthritisauslösung therapierten Gruppe. Einschränkend muss allerdings vermerkt werden, dass der Zeitpunkt der histologischen Beurteilung an Tag 21 in die chronische Phase des Arthritismodelles fällt und somit die Effekte in der akuten Phase nicht erfasst werden können.

Histologisch ist bereits für eine Therapie mit 2,5mg Rolipram/kg Körpergewicht ein signifikanter therapeutischer Effekt sichtbar, für die Gelenkschwellung war dies nicht signifikant nachweisbar (Abb.8).

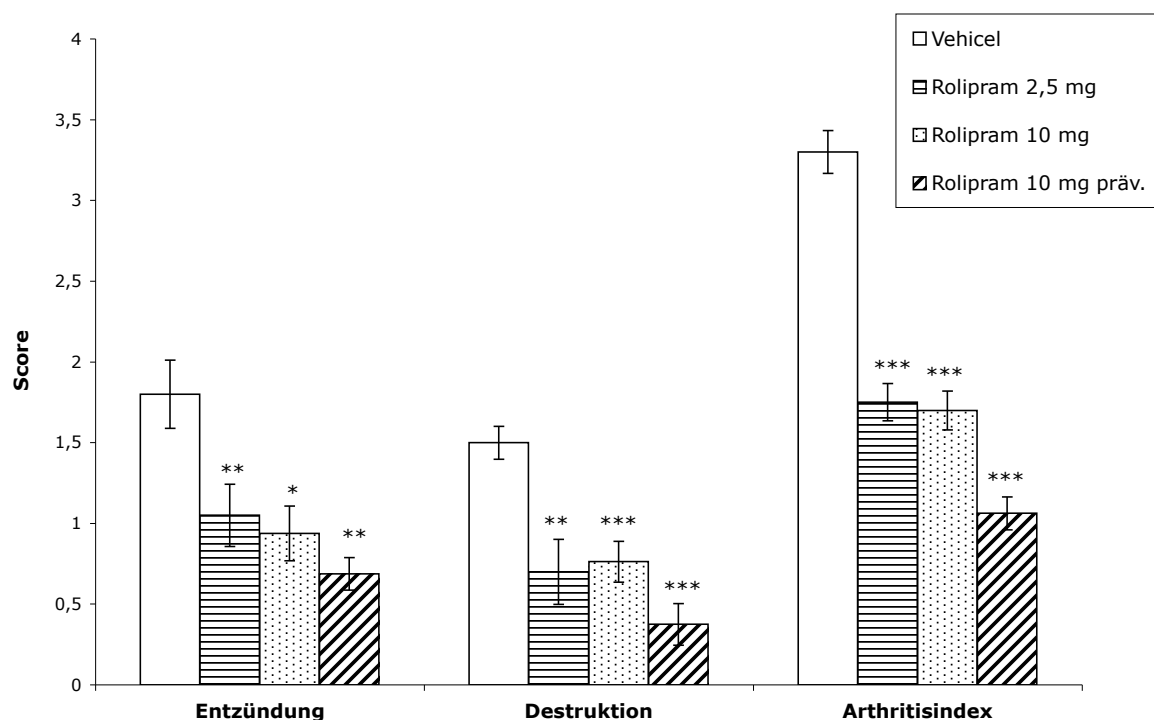


Abb.8: Beispiel für die histologischen Gelenkveränderungen bei C57BL/6-Mäusen (n=10, Mittelwert \pm Standardfehler, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$); Vehicel: Kontrollgruppe mit Arthritis, Behandlung mit Polyethylenglykol ab d0, Rolipram 2,5mg: mit Rolipram 2,5 mg/kg Körpergewicht ab d0 therapierte Arthritistiere, Rolipram 10mg: mit Rolipram 10mg/kg Körpergewicht ab d0 therapierte Arthritistiere, Rolipram 10mg: mit Rolipram 10mg/kg Körpergewicht ab dem Tag 14 vor Arthritisinduktion therapierte Arthritistiere; Gruppenstärke n=10; Signifikanzberechnung: Therapiegruppe gegen Vehicelgruppe

In einem weiteren Experiment konnten diese Ergebnisse weitgehend bestätigt werden. Die mit Rolipram in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht behandelte Therapiegruppe zeigte am Tag 21 nach Arthritisauslösung eine signifikant niedrigere Entzündung und Knorpeldestruktion als die mit dem Vehicel (Natriumchlorid) therapierten Tiere. Der Gesamtarthritisindex für alle histologischen Veränderungen unterschied sich dabei in der Therapiegruppe sehr signifikant von dem der Kontrollgruppe (Tabellen 6-8).

Tabelle 6: Übersicht über die histologischen Gelenkveränderungen in 3 verschiedenen Serien unter Therapie mit Rolipram (10mg/kg Körpergewicht) bei C57BL/6-Mäusen (Arthritisscore \pm Standardfehler); Gruppenstärke n=10; Signifikanz Therapiegruppe (Rolipram) gegen Vehicelgruppe (Kontrollgruppe, behandelt mit Polyethylenglycol)

Serie		Rolipram 10mg	Vehicel	p
1	Entzündung	1,3 \pm 0,2	2,1 \pm 0,1	< 0,01 (**)
	Knorpelindex	0,7 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2	0,06
	Arthritisindex	2,1 \pm 0,3	3,2 \pm 0,3	< 0,01 (**)
2	Entzündung	0,9 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2	0,04 (*)
	Knorpelindex	0,8 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3	< 0,001 (***)
	Arthritisindex	1,7 \pm 0,2	3,3 \pm 0,1	< 0,001 (***)
3	Entzündung	1,1 \pm 0,2	2,0 \pm 0,3	0,02 (*)
	Knorpelindex	0,7 \pm 0,2	1,7 \pm 0,4	0,02(*)
	Arthritisindex	1,8 \pm 0,3	3,7 \pm 0,6	< 0,01 (**)

Tabelle 7: Übersicht über die histologischen Gelenkveränderungen unter Therapie mit Rolipram der Konzentrationen 2,5 und 10mg/ kg Körpergewicht ab der Arthritisinduktion sowie 10mg/kg Körpergewicht 14 Tage vor Arthritisinduktion bei C57BL/6-Mäusen (Arthritisscore \pm Standardfehler); Gruppenstärke n=10

	Entzündung	p (Therapiegruppe/ Vehicel)	Knorpel- index	p (Therapiegruppe/ Vehicel)	Arthritis- index	p (Therapiegruppe/ Vehicel)
Vehicel	1,8 \pm 0,2		1,5 \pm 0,1		3,3 \pm 0,1	
Rolipram 2,5 mg	1,1 \pm 0,2	< 0,01 (**)	0,7 \pm 0,2	< 0,01 (**)	1,8 \pm 0,1	< 0,001 (***)
Rolipram 10 mg	0,9 \pm 0,2	0,04	0,8 \pm 0,1	< 0,001 (***)	1,7 \pm 0,1	< 0,001 (***)
Rolipram 10 mg präventiv	0,7 \pm 0,1	< 0,01 (**)	0,4 \pm 0,1	< 0,001 (***)	1,1 \pm 0,1	< 0,001 (***)

Die gleichen Ergebnisse erbrachte eine Therapie mit dem anti-CD4-Antikörper GK1.5 allein bzw. in Kombination mit Rolipram in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht: die Arthritisscores als Ausdruck der histologischen Gelenkschädigung durch die Arthritis liegen in allen Therapiegruppen signifikant unter der Kontrollgruppe. Eine signifikante Unterscheidung der Therapiegruppen untereinander ist bezüglich der Arthritisscores jedoch nicht möglich. Insbesondere bildet sich der klinisch beobachtete additive Effekt einer Behandlung mit dem anti-CD4-Antikörper GK1.5 zusätzlich zur Rolipramtherapie histologisch nicht deutlich ab.

Zwar ist ein Trend der geringeren Ausprägung von Mesothelabnormitäten und zellulärem Infiltrat erkennbar, die sich rechnerisch auch im gesamthistologischen Index niederschlägt, jedoch sind diese Unterschiede gegenüber den Einzeltherapien nicht statistisch signifikant.

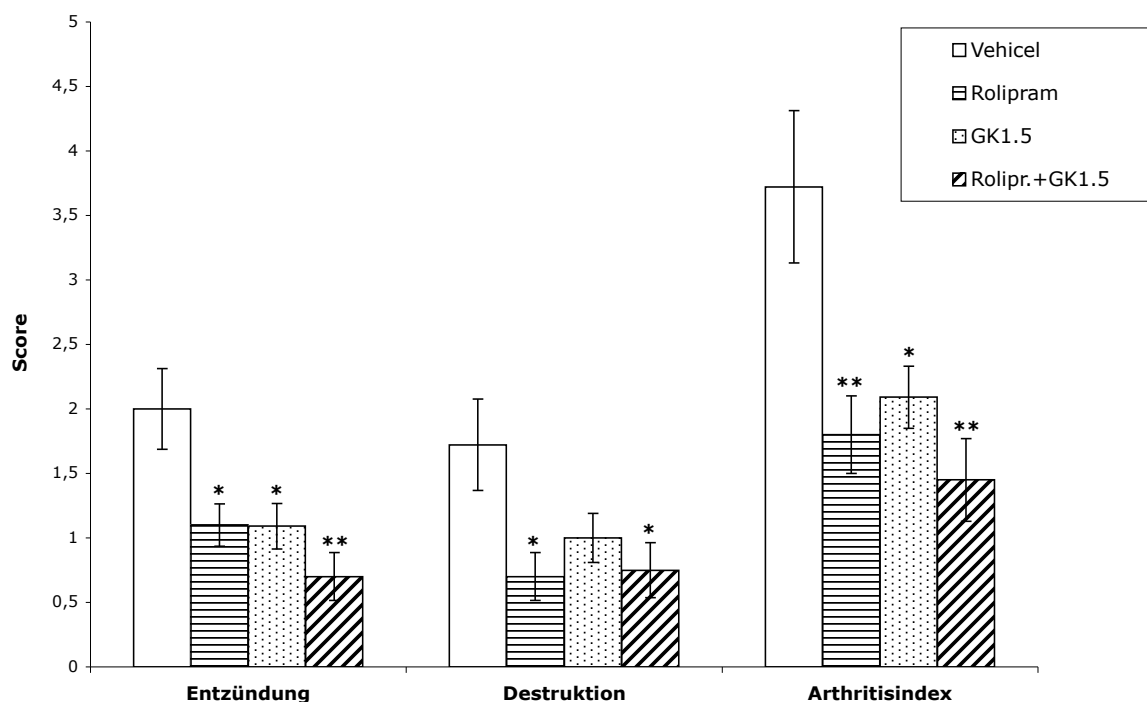


Abb.9: Beispiel für die histologischen Gelenkveränderungen bei C57BL/6-Mäusen (n=10, Mittelwert + Standardfehler, **p<0,01, *p<0,05); Vehicel: Kontrollgruppe mit Arthritis, Behandlung mit NaCl und Ratten-Immunglobulin ab d0, Rolipram: mit Rolipram 10mg/kg Körpergewicht ab d0 therapierte Arthritistiere, GK1.5: mit dem Antikörper GK1.5 ab d0 therapierte Arthritistiere, Roli+GK1.5: mit Rolipram 10mg/ kg Körpergewicht und dem Antikörper GK 1.5 ab d0 therapierte Arthritistiere; Gruppenstärke n=10; Signifikanzberechnung Therapiegruppe gegen Vehicelgruppe

Tabelle 8: Übersicht über die histologischen Gelenkveränderungen unter Therapie mit Rolipram 10mg/ kg Körpergewicht, GK1.5 mAb bzw. einer Kombination aus Rolipram 10mg/kg Körpergewicht und GK1.5 mAb bei C57BL/6-Mäusen ; Gruppenstärke n=10

	Entzündung	p (Therapiegruppe/ Vehicel)	Knorpel- index	p (Therapiegruppe/ Vehicel)	Arthritis- index	p (Therapiegruppe/ Vehicel)
Vehicel	2,0 ± 0,2		1,7 ± 0,2		3,7 ± 0,3	
Rolipram 10mg	1,1 ± 0,3	0,02	0,7 ± 0,4	0,01	1,8 ± 0,6	< 0,01 (**)
GK1.5	1,1 ± 0,2	0,02	1,0 ± 0,2	0,08	2,1 ± 0,2	0,01 (**)
Rolipram 10mg+ GK1.5	0,7 ± 0,2	< 0,01 (**)	0,8 ± 0,2	0,028	1,5 ± 0,3	< 0,01 (**)

5.1.5. Zusammenfassung der klinischen Ergebnisse im Rahmen der Therapiestudien

Der Verlauf der Knieschwellung konnte durch die Verabreichung von 10mg/kg Körpergewicht Rolipram deutlich in seinem Maximum während der akuten Phase der Arthritis gehemmt werden, wobei dieser Effekt signifikant stärker bei präventiver Therapie mit Rolipram war. Ebenso wurde das Niveau der Schwellungsaktivität in der chronischen Phase mit Rolipram in der Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht deutlich gesenkt. Durch die zusätzliche Therapie mit dem anti-CD4-Antikörper GK1.5 lässt sich ein additiver Effekt auf den Verlauf der Schwellungskurve erzielen. Mit dem selektiveren Phosphodiesterase IV-Inhibitor Piclamilast (RP73401) lässt sich bereits mit einer Konzentration von 2,5mg/kg Körpergewicht eine signifikante klinische Reduktion der Knieschwellung erreichen.

Sowohl Rolipram in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht, der anti-CD4-Antikörper GK1.5 als auch RP73401 (Piclamilast) zeigten eine signifikante Verringerung der mittels DTH-Reaktion gemessenen T-Zell-Reaktivität in vivo. Dabei war ein Trend zur additiven Wirkung der Therapie mit Rolipram und GK1.5 sichtbar, der sich jedoch nicht als statistisch signifikant erwies.

Insgesamt lässt sich sagen, dass 21 Tage nach Arthritisauslösung eine deutliche und statistisch signifikante Beeinflussung der Entzündung und Gelenkdestruktion durch eine Therapie mit dem Phosphodiesterase IV-Inhibitor Rolipram histologisch nachweisbar ist.

Bereits eine Konzentration von 2,5mg Rolipram/kg Körpergewicht erwies sich als histologisch wirksam. Die präventive Administration von Rolipram in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht zeigte einen besseren therapeutischen Effekt als die Verabreichung der gleichen Konzentration an Rolipram ab dem Tag der Arthritisauslösung (d0), dieser Zusammenhang war jedoch nicht statistisch signifikant. Während klinisch additive Effekte einer Therapie mit 10mg Rolipram/kg Körpergewicht und dem anti-CD4-Antikörper GK1.5 zu beobachten waren, konnte histologisch hierfür keine Signifikanz gezeigt werden.

5.2. Beeinflussung der Aktivität von Makrophagen, Lymphozyten und Synoviozyten in vitro durch den Phosphodiesterase IV-Inhibitor Rolipram

Ausgehend von der nachgewiesenen klinischen Wirksamkeit einer Therapie mit Phosphodiesterase IV-Inhibitoren im Arthritismodell der Maus soll in den folgenden Studien eine Aufgliederung der Wirksamkeit auf die verschiedenen im Pathogeneseprozess der RA beteiligten Zellpopulationen in vitro erfolgen.

Als wichtigste an der Genese der RA beteiligte Zellpopulationen stellen sich Makrophagen, Lymphozyten und Synoviozyten dar.

5.2.1. Beeinflussung der Aktivität von Makrophagen

Makrophagen fungieren im Pathogenesemodell der RA sowohl als Antigen-präsentierende Zellen, als auch als Effektorzellen der T-Zell-Aktivierung und Vermittler der Entzündungsreaktion. Sie werden durch bestimmte molekulare Strukturen von Mikroorganismen, vermittelt durch die so genannten Toll-Like-Rezeptoren (TLR), aktiviert und sind dann in der Lage, durch die Ausbildung von kostimulierenden Molekülen und einem spezifischen Zytokinspektrum eine T-Zell-Antwort zu induzieren. Außerdem produzieren derart aktivierte Makrophagen eine Reihe von entzündungsregulierenden Faktoren, wie die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6, NO sowie das antiinflammatorisch wirksame IL-10. Diesem Zytokinspektrum der Makrophagen kommt also eine entscheidende Rolle in der Regulation der hervorgerufenen Entzündungsreaktion zu.

Aus diesem Grunde sollte in einer weiteren Studie die Wirkung der Phosphodiesteraseinhibitoren auf eine Zellkultur von Makrophagen aus arthritischen Mäusen untersucht werden. Die Makrophagen wurden durch Peritoneallavage aus arthritischen C57Bl/6-Mäusen gewonnen und in Kultur genommen. Nach Inkubation mit dem Phosphodiesteraseinhibitor Rolipram in aufsteigender Konzentration (0,01 μ Mol bis 10 μ Mol) im Medium erfolgte die Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) und IFN- γ .

Die nach 48 Stunden Kulturzeit geernteten Überstände wurden jeweils mittels ELISA bzw. Bioassay auf die Konzentration von TNF- α , IL-10, IL-6 und IL-1 β sowie mittels Griess-Reaktion auf NO untersucht.

Als einer der Schlüsselmediatoren der Entzündung wurde das Augenmerk zunächst auf TNF- α gelegt. Der Nachweis dieser Substanz erfolgte mittels ELISA. Hierbei zeigte sich eine

deutliche Reduktion des von den Makrophagen produzierten TNF- α im Kulturüberstand bei Konzentrationen bis 0,1 μ Mol Rolipram. Erhöht man die Dosis der Therapiesubstanz im Zellkulturansatz, zeigt sich eine Verringerung dieses TNF- α -supprimierenden Effektes. Bei 10 μ Mol Rolipram wird die Ausgangskonzentration an produziertem TNF- α (ohne Inhibitor stimulierte Makrophagen) wieder erreicht (Abb.10).

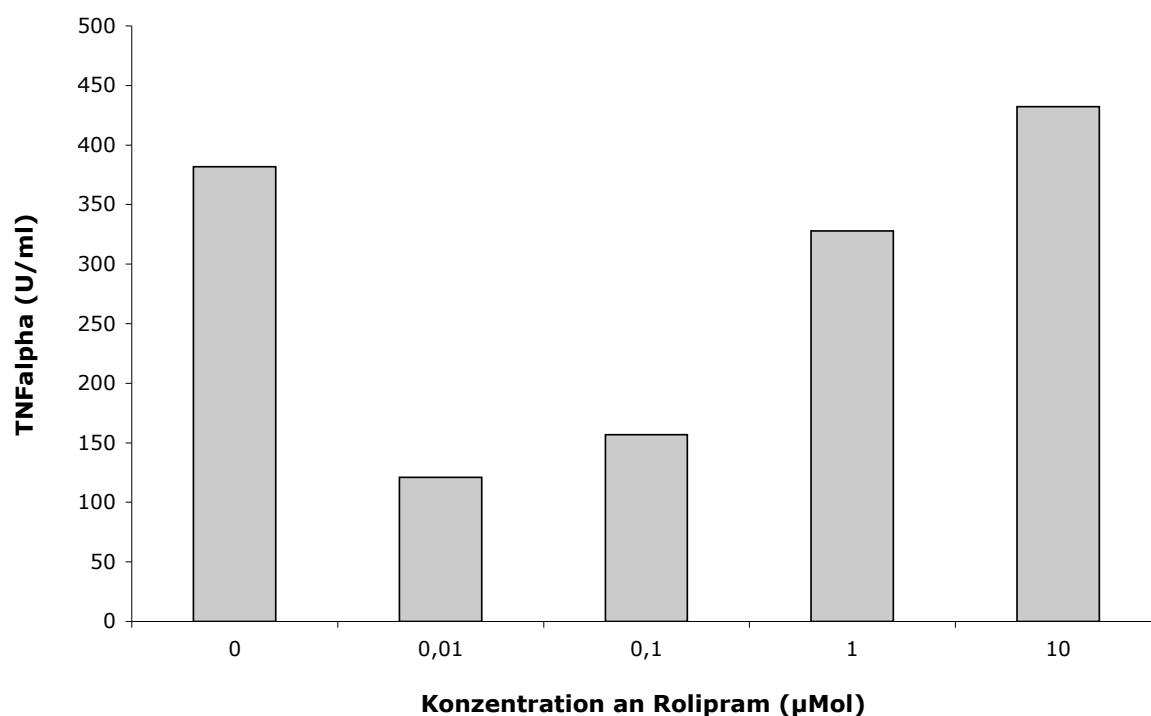


Abb.10: Konzentration an TNF- α im Kulturüberstand LPS/IFN- γ -stimulierter Makrophagen unter Einfluss von Rolipram; Messung mittels ELISA

Das von den Makrophagen nach Aktivierung gebildete proinflammatorische Interleukin 6 führt zur Aktivierung von Lymphozyten und fördert die Produktion von Immunglobulinen. Systemisch fördert IL-6 die Akutphasereaktion durch Anregung der Bildung der Akutphaseproteine in der Leber.

Durch Hinzugabe des PhosphodiesteraseIV-Inhibitors Rolipram in die stimulierte Makrophagenzellkultur erreicht man zunächst eine diskrete Erhöhung der Produktion an IL-6 (0,01 μ Mol bis 1 μ Mol Rolipram). Bei Verwendung höherer Konzentrationen des Inhibitors sinkt die Produktion an IL-6 deutlich unter das Niveau der stimulierten und unbehandelten Vergleichsprobe ab (Abb.11, 12).

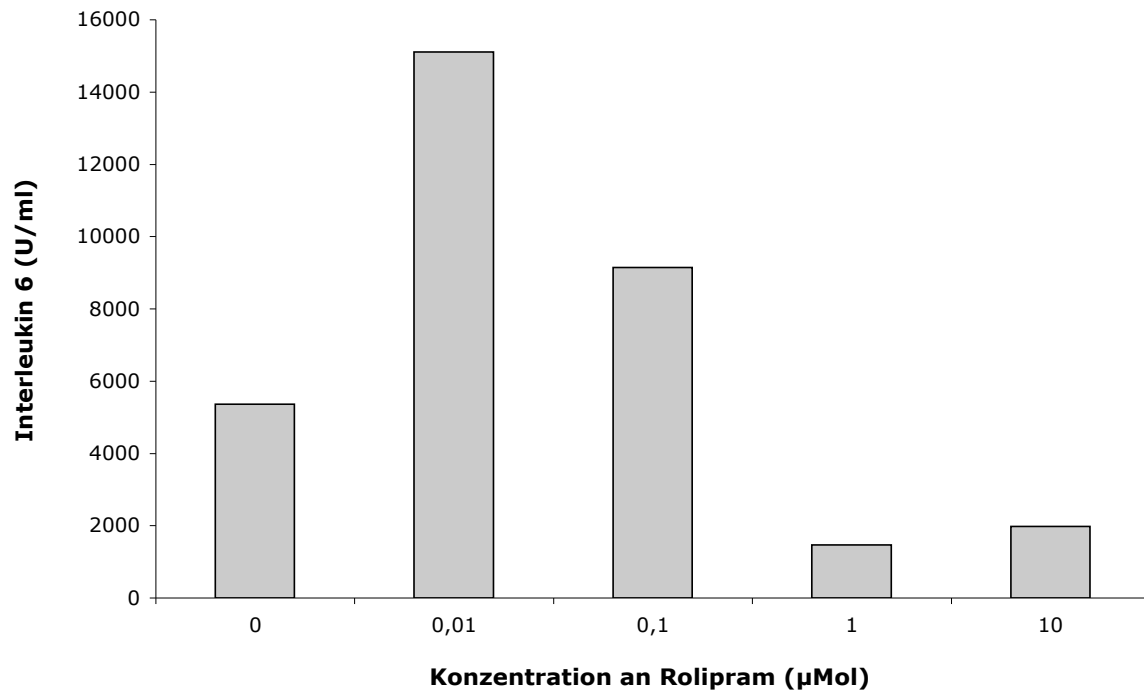


Abb.11: Konzentration an Interleukin 6 im Kulturüberstand LPS/IFN- γ -stimulierter Makrophagen unter Einfluss von Rolipram; Messung mittels Bioassay

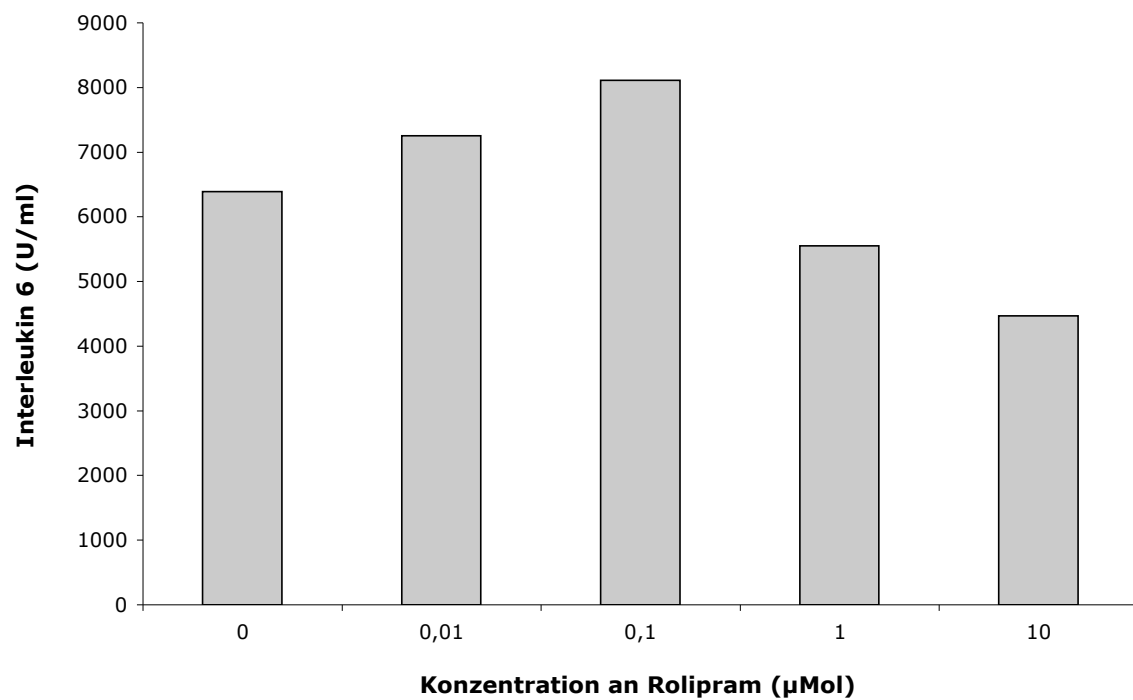


Abb.12: Konzentration an Interleukin 6 im Kulturüberstand LPS/IFN- γ -stimulierter Makrophagen unter Einfluss von Rolipram; Messung mittels ELISA

Aktivierte Makrophagen sind in der Lage, Interleukin 1 (IL-1 β) zu synthetisieren, das insbesondere auf Gefäßendothelien wirkt, die Migration von Effektorzellen ins entzündete Gewebe begünstigt und die Akutphasereaktion unterstützt.

Durch die Zugabe von Rolipram zur stimulierten Makrophagenkultur konnte kein signifikanter Effekt auf die Produktion an IL-1 β erzielt werden (Abb.13).

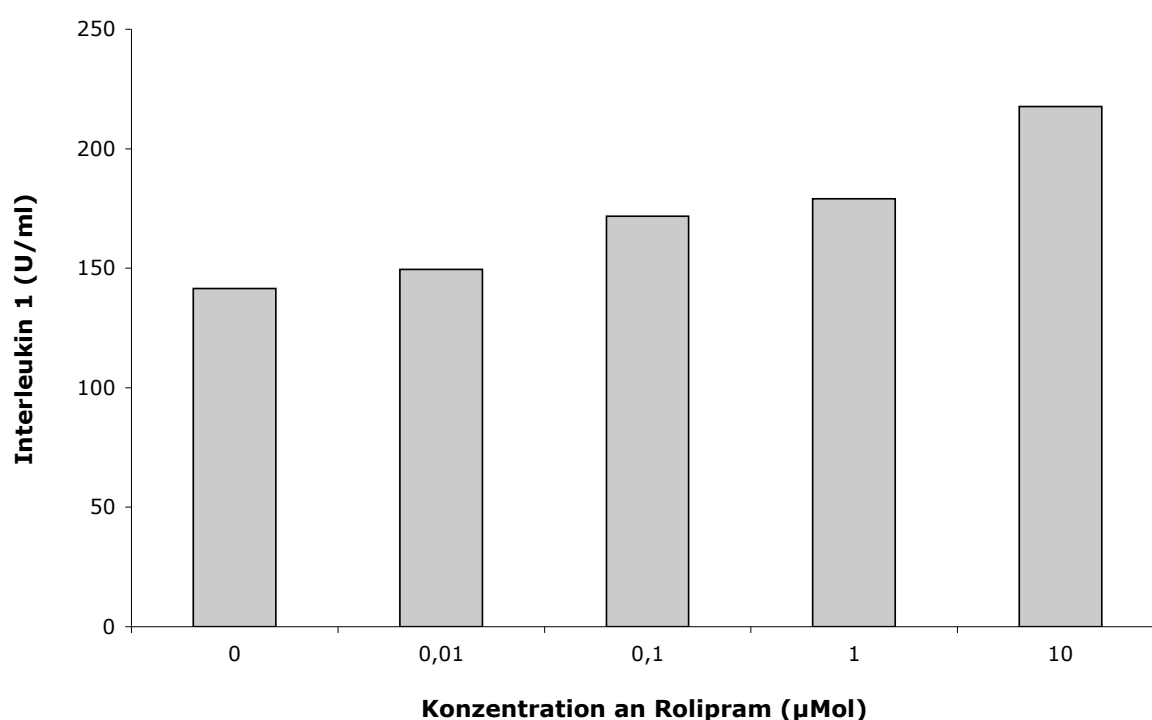


Abb.13: Konzentration an Interleukin-1 β , Messung mittels ELISA, im Kulturüberstand LPS/IFN- γ -stimulierter Makrophagen unter Einfluss von Rolipram

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Mediator verschiedener Entzündungsvorgänge, ein Effektormolekül der Zellaktivierung, kann die Produktion vieler Entzündungsmediatoren in Makrophagen, Leukozyten und Endothelzellen beeinflussen und wirkt als Antioxidans.

Es erfolgte die Messung von Stickstoffmonoxid (NO) in den Kulturüberständen der Makrophagen mit und ohne Zusatz von Rolipram. In diesem Ansatz ließ sich keine signifikante Beeinflussung der NO-Produktion der Makrophagen durch den Phosphodiesteraseinhibitor zeigen (Abb.14).

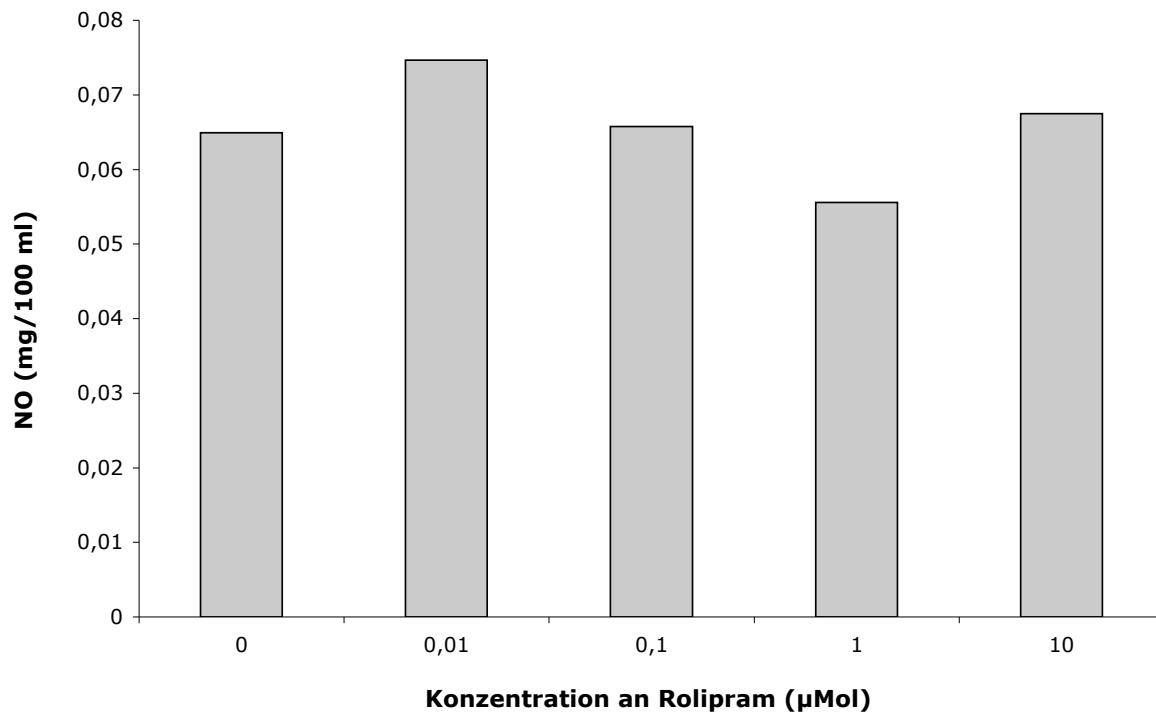


Abb.14: Konzentration an Stickoxid (NO), Messung mittels NO-Test, im Kulturüberstand LPS/IFN- γ -stimulierter Makrophagen unter Einfluss von Rolipram

Interleukin 10 kommt eine entscheidende Rolle in der Regulation von Entzündungsvorgängen zu. Dabei wirkt es antiinflammatorisch durch die Inhibition der Aktivierung von Th1-Zellen und eine Suppression der Mediatorfreisetzung aus Makrophagen.

Das Vorhandensein des Phosphodiesterase IV-Inhibitors Rolipram in der Makrophagenzellkultur bedingt eine signifikante Steigerung der Produktion von IL-10 durch die Makrophagen. Diese Wirkung ist in einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,1 μ Mol Rolipram vorhanden aber weniger ausgeprägt als im übrigen Dosisbereich (Abb.15).

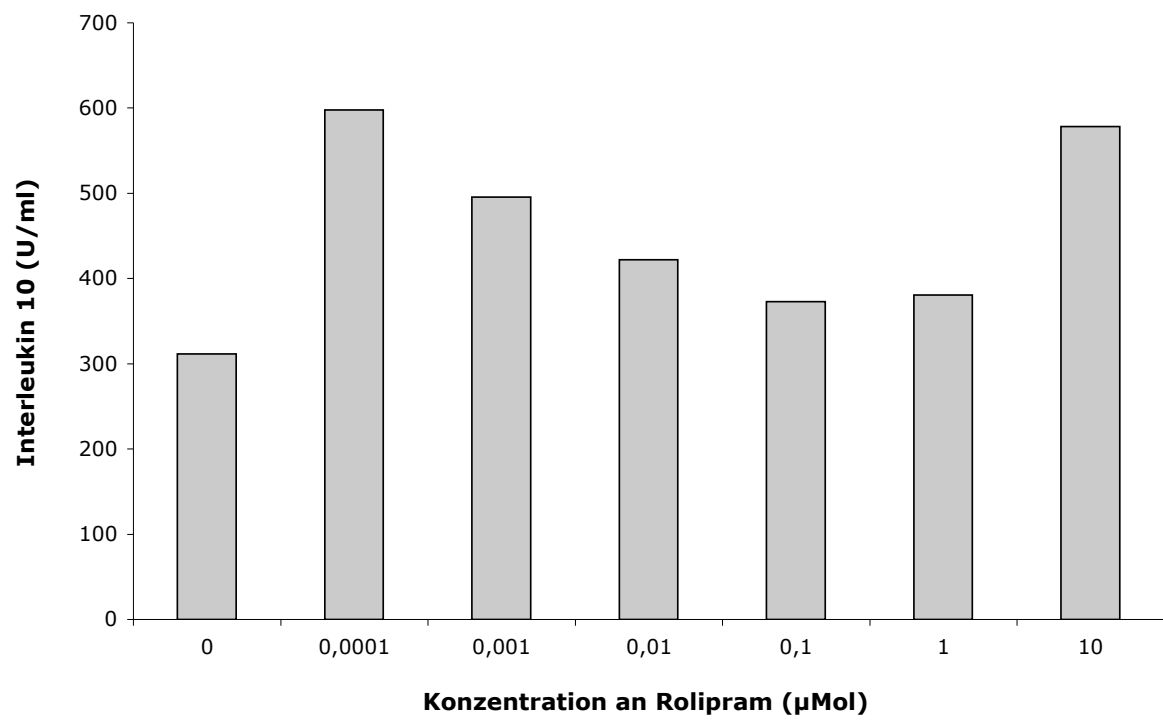
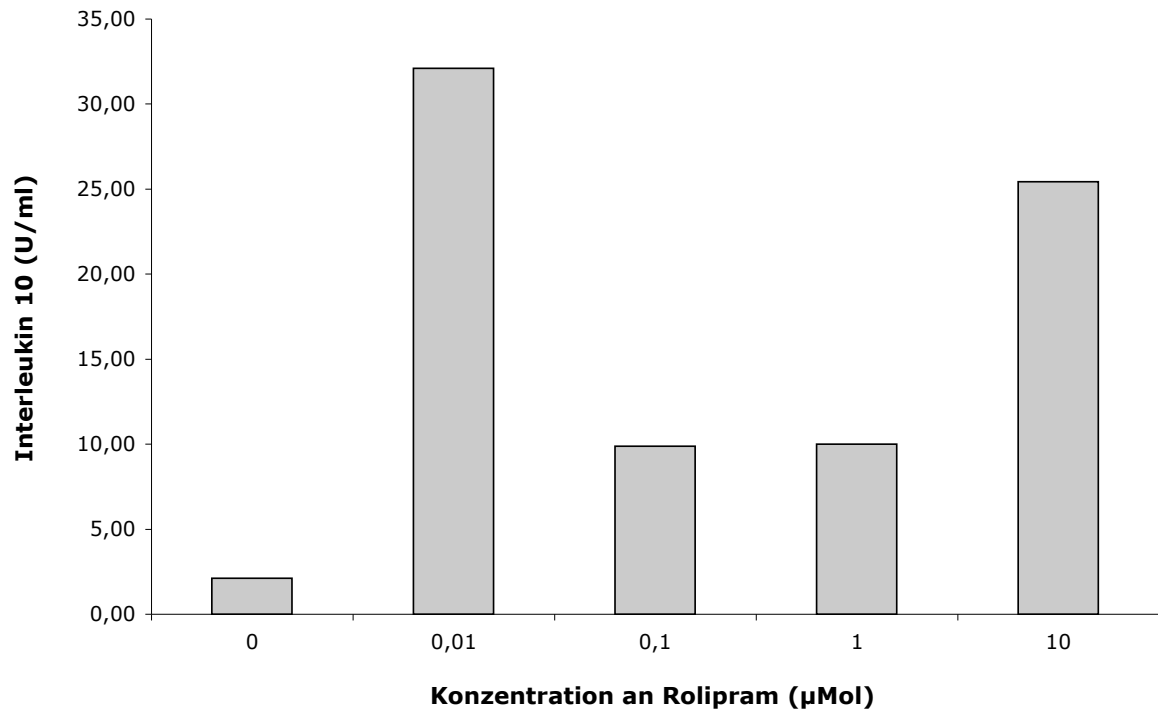


Abb.15: Konzentration an Interleukin 10 im Kulturüberstand LPS/IFN- γ -stimulierter Makrophagen unter Einfluss von Rolipram; Messung mittels ELISA

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Gegenwart von Rolipram in der Makrophagenzellkultur eine deutliche Senkung der Produktion des proinflammatorischen $\text{TNF-}\alpha$ sowie eine Steigerung der Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 zu beobachten ist. Die Konzentration von IL-6 wird durch den Phosphodiesteraseinhibitor in höheren Konzentrationen gehemmt. Für unphysiologisch hohe Dosen des Inhibitors ist eine teilweise Aufhebung der Effekte zu beobachten.

5.2.2. Beeinflussung der Aktivität von Milzlymphozyten

Zunächst sollte der Einfluss von Rolipram auf das Proliferationsverhalten stimulierter Milzlymphozyten untersucht werden. Die Stimulation der gepoolten Milzzellen erfolgte zum einen durch das T-Zell-Mitogen Concanavalin A (Con A) in einer Konzentration von 1, 5 und $10\mu\text{g/ml}$ sowie durch das spezifische Antigen mBSA in einer Konzentration von 1,25, 2,5 und $5\mu\text{g/ml}$.

Für die antigenstimulierten Milzzellen lässt sich eine deutlich in Abhängigkeit von der steigenden Rolipramkonzentration gehemmte Proliferation darstellen. Zumindest für eine Stimulation mit $1\mu\text{g/ml}$ und $10\mu\text{g/ml}$ mBSA ist dieser Zusammenhang statistisch signifikant (Abb. 16).

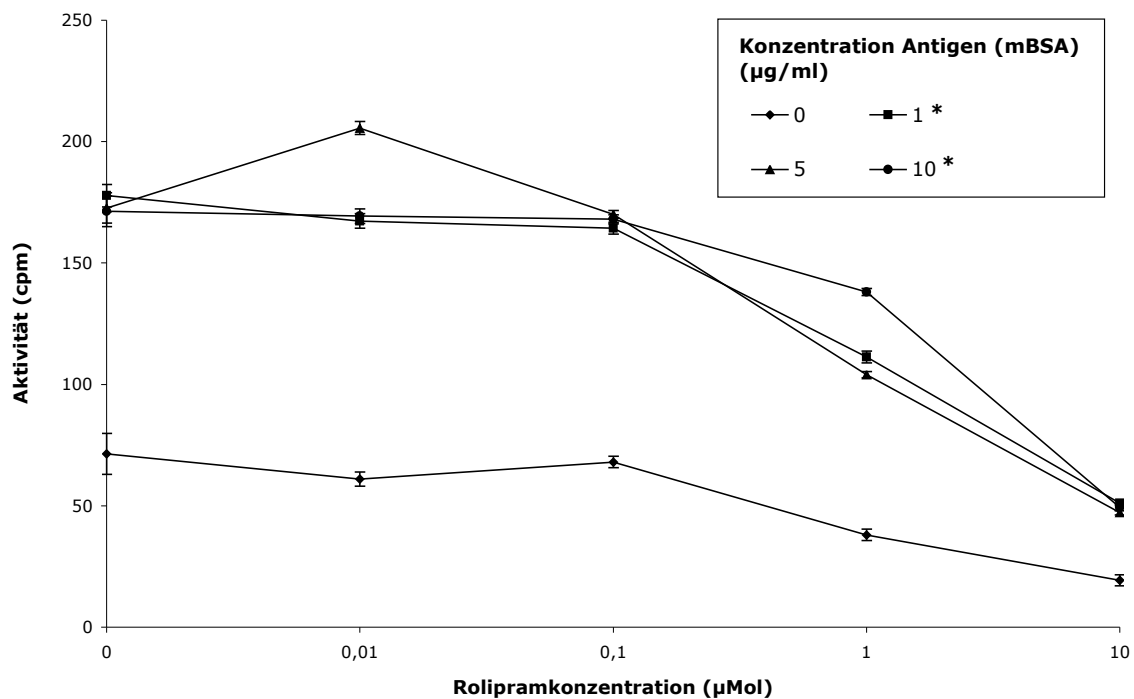


Abb.16: Lymphozytenproliferation in Abhängigkeit von der Konzentration an Rolipram. Stimulation von Milzzellen aus immunisierten C57BL/6-Mäusen mit dem Antigen mBSA. * $p < 0,05$ (Spearman)

Die mitogenstimulierte Proliferation der gepoolten Milzzellen zeigt einen noch deutlicheren Zusammenhang: für alle ConA-Konzentrationen sinkt die Proliferation der Zellen mit steigender Rolipramdosis statistisch signifikant ab (Abb. 17).

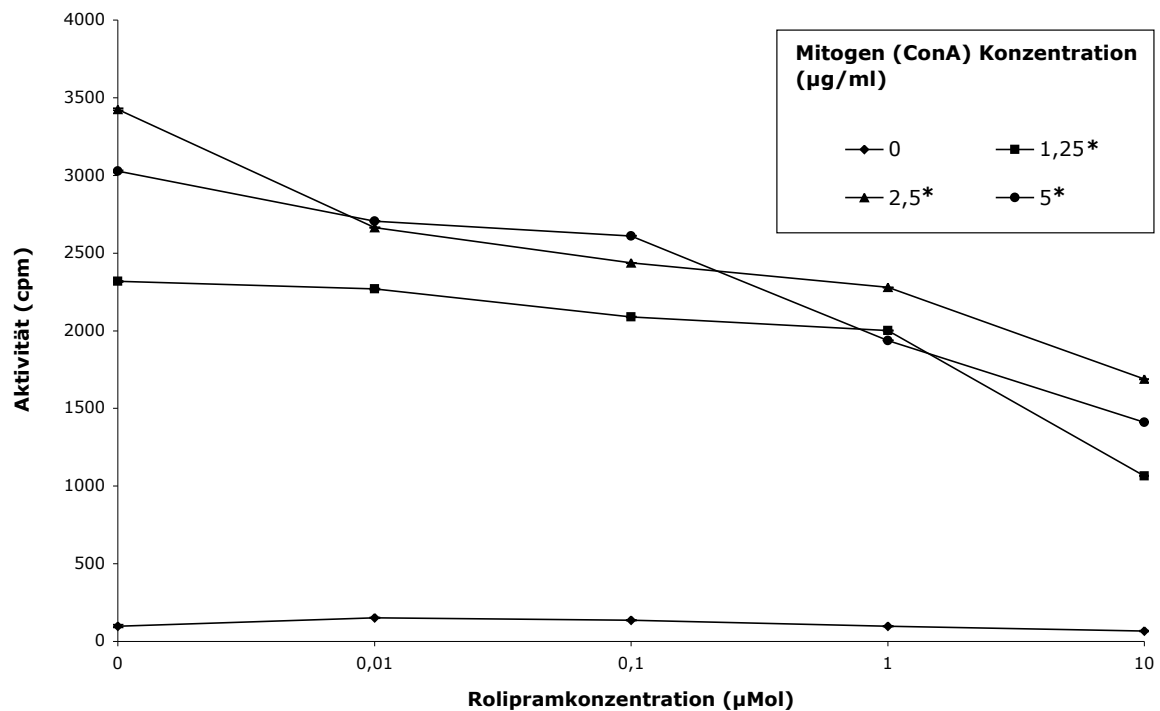


Abb.17: Lymphozytenproliferation in Abhängigkeit von der Konzentration an Rolipram. Stimulation von Milzzellen aus immunisierten C57BL/6-Mäusen mit dem Mitogen Concanavalin A. * $p < 0,05$ (Spearman)

Somit lässt sich insgesamt eine deutliche Hemmung der Proliferation von aktivierten Lymphozyten, die ja den Hauptanteil der Zellen einer gepoolten Milzzellsuspension darstellen, durch steigende Dosen des selektiven Phosphodiesterase IV-Inhibitors Rolipram ableiten.

Für die weiteren Untersuchungen wurde die Milzzellsuspension arthritischer Mäuse (7. Tag nach Arthritisinduktion) mit $5\mu\text{g/ml}$ Con A stimuliert und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Phosphodiesterase IV-Inhibitors Rolipram inkubiert.

IL-2 ist ein T-Zell-Wachstumsfaktor, der von stimulierten T-Lymphozyten sezerniert wird. Er dient somit als Indikator der Proliferation von naiven T-Helferzellen.

Mit steigender Rolipramkonzentration zeigte sich eine deutliche Hemmung der Produktion von IL-2 in der mitogenstimulierten Milzzellkultur. Dieser Zusammenhang ist signifikant (Abb. 18).

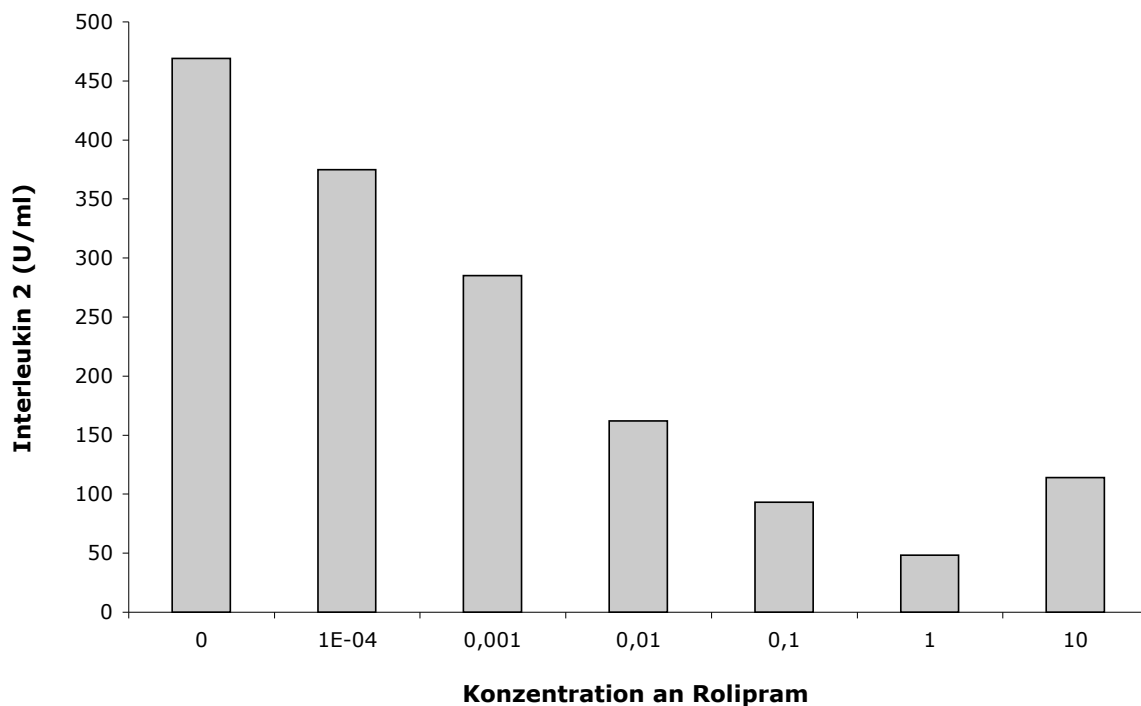


Abb.18: Konzentration an Interleukin 2 im Kulturüberstand von Milzlymphozyten arthritischer C57BL/6-Mäuse nach Stimulation mit $5\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A unter Einfluss von Rolipram; Messung mittels ELISA; die Korrelation zwischen IL-2-Konzentration und Rolipramkonzentration ist signifikant: $p < 0,05$ (Spearman)

Weiterhin ist für die Pathogenese die Differenzierung der naiven T-Helferzellen von entscheidender Bedeutung. Als Indikatorzytokin für die Th1-Zellen gilt das IFN- γ , für Th2-Zellen das IL-4. Das Verhältnis der beiden Zytokine als Hauptprodukte der beiden Th-Zell-Subpopulationen gibt also einen Hinweis auf das Verhältnis der Anzahl von Th1- und Th2-Zellen in der Zellkultur. Die Produktion von IL-4 wird durch die Zugabe von Rolipram in steigender Konzentration signifikant gehemmt. Auch die IFN- γ -Ausschüttung sinkt mit der steigenden Konzentration des Phosphodiesteraseinhibitors signifikant. Erst durch die Bestimmung des Verhältnisses der Interleukine zueinander wird deutlich, dass die Produktion von IFN- γ sehr viel mehr gehemmt wird als die von IL-4 (Abb. 19 und 20).

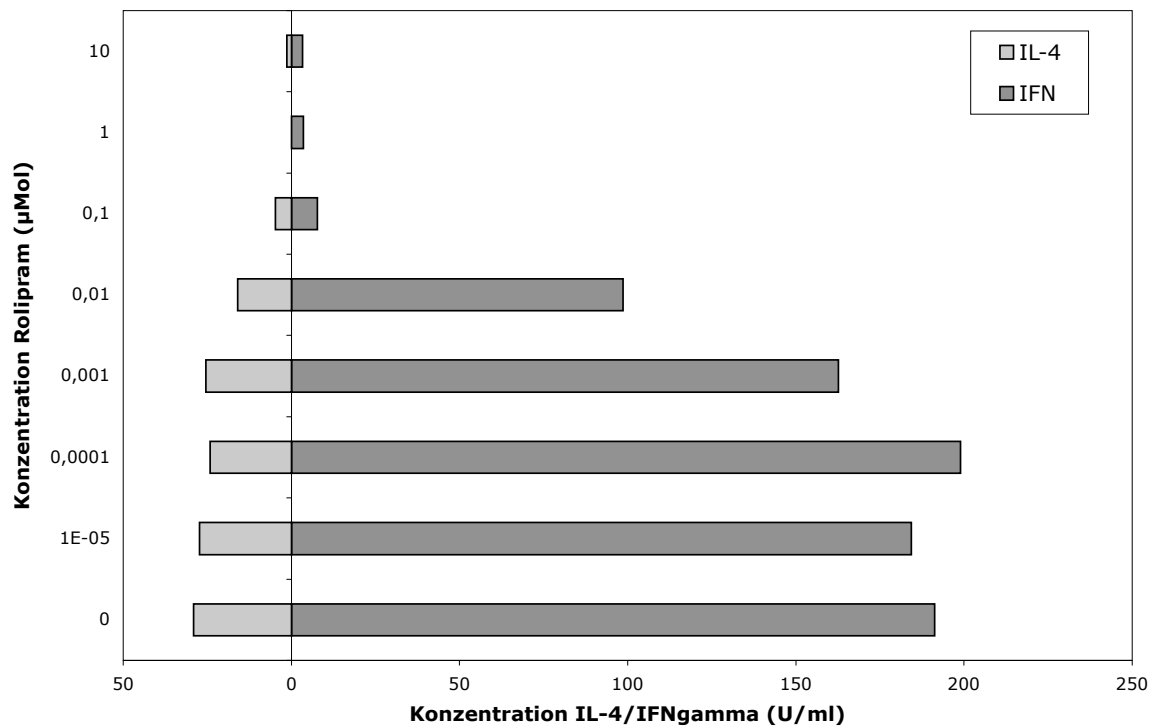


Abb.19: Beeinflussung der Th1/Th2-Balance durch Rolipram anhand des Zytokinmusters. Milzlymphozyten arthritischer C57BL/6-Mäuse nach Stimulation mit $5\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A, Messmethode: ELISA

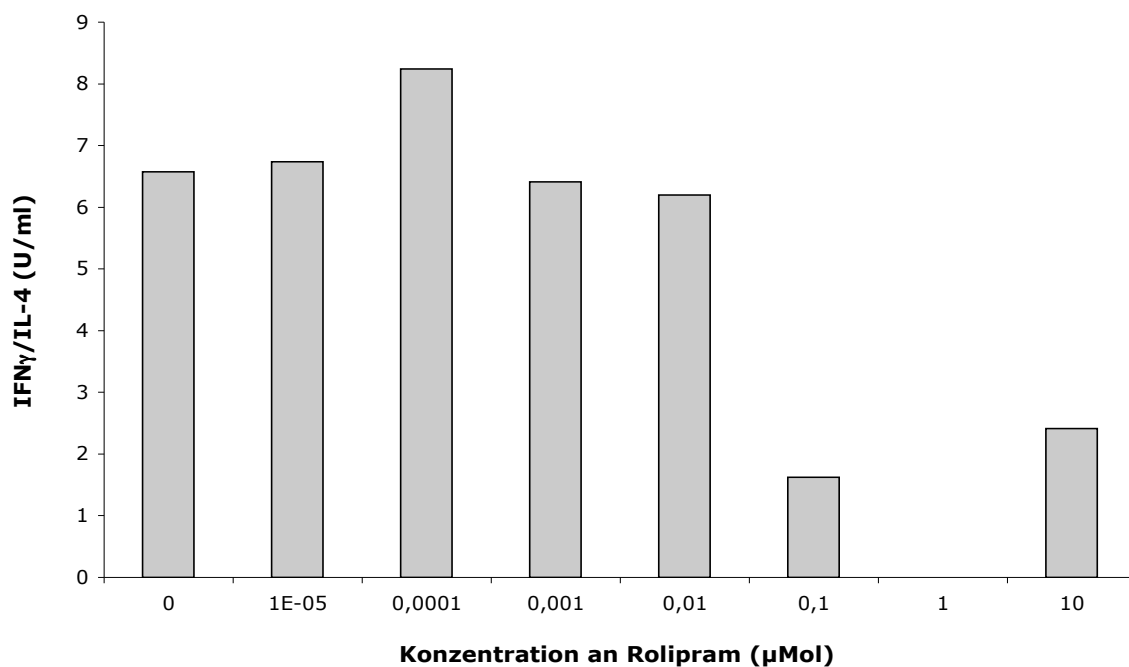


Abb.20: Beeinflussung der Th1/Th2-Balance durch Rolipram anhand des Zytokinmusters. Verhältnis des produzierten IFN- γ zu IL-4 aus Milzlymphozyten arthritischer C57BL/6-Mäuse nach Stimulation mit $5\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A, Messmethode: ELISA

Zusammenfassend lässt sich also zum einen eine Hemmung der Proliferation von T-Zellen in vitro durch die Zugabe steigender Konzentrationen an Rolipram nachweisen. Dies zeigt der Lymphozytenproliferationstest sehr deutlich. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die gezeigte deutliche Hemmung von IL-2 als Indikatorzytokin naiver T-Helfer-Lymphozyten. Mit zunehmender Rolipramkonzentration wird die Produktion von IFN- γ sehr viel stärker gehemmt als die Ausschüttung von IL-4. Dies ist ein deutlicher Hinweis für eine Hemmung der Th1-Zellen oder eine verstärkte Differenzierung der naiven Th-Zellen hin zur Th2-Subpopulation.

5.2.3. Beeinflussung der Aktivität von Synoviozyten

Die Zellen der synovialen Deckzellschicht sind entscheidend am Pathogeneseprozess der Rheumatoiden Arthritis beteiligt. Man unterscheidet Typ A-Synoviozyten, die eher makrophagenähnliche Eigenschaften haben, von fibroblastenähnlichen Typ B-Synoviozyten. Insbesondere die Typ B-Zellen rücken immer mehr ins pathogenetische Interesse der Erkrankung. Sie überexprimieren im Rahmen der RA verschiedene Adhäsionsmoleküle, die für die Ausbildung des Entzündungszellinfiltrates wichtig sind und sezernieren Matrixmetalloproteinasen (Kollagenasen, Stromelysin) und Kathepsine, wodurch sie entscheidend an der Knorpel- und Knochendestruktion beteiligt sind.

Es wurden Synovialzellen aus den Kniegelenken arthritischer Ratten isoliert und kultiviert. Nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon gamma (IFN- γ) erfolgte die Inkubation mit dem Phosphodiesterase IV-Inhibitor Rolipram in unterschiedlicher Konzentration.

Als allgemeiner Aktivierungsmarker für Synoviozyten kann Stickstoffmonoxid (NO) gelten. In Konzentrationen von $0,01\mu\text{Mol}$ bis $0,1\mu\text{Mol}$ Rolipram konnte eine deutliche Senkung der NO-Produktion verzeichnet werden. Bei Anwendung höherer Konzentrationen ($1\mu\text{Mol}$ bis $10\mu\text{Mol}$ Rolipram) steigt die Produktion von NO wieder deutlich an und erreicht bei $10\mu\text{Mol}$ Rolipram in der Zellkultur wieder das Niveau der stimulierten und unbehandelten Vergleichsprobe (Abb. 21).

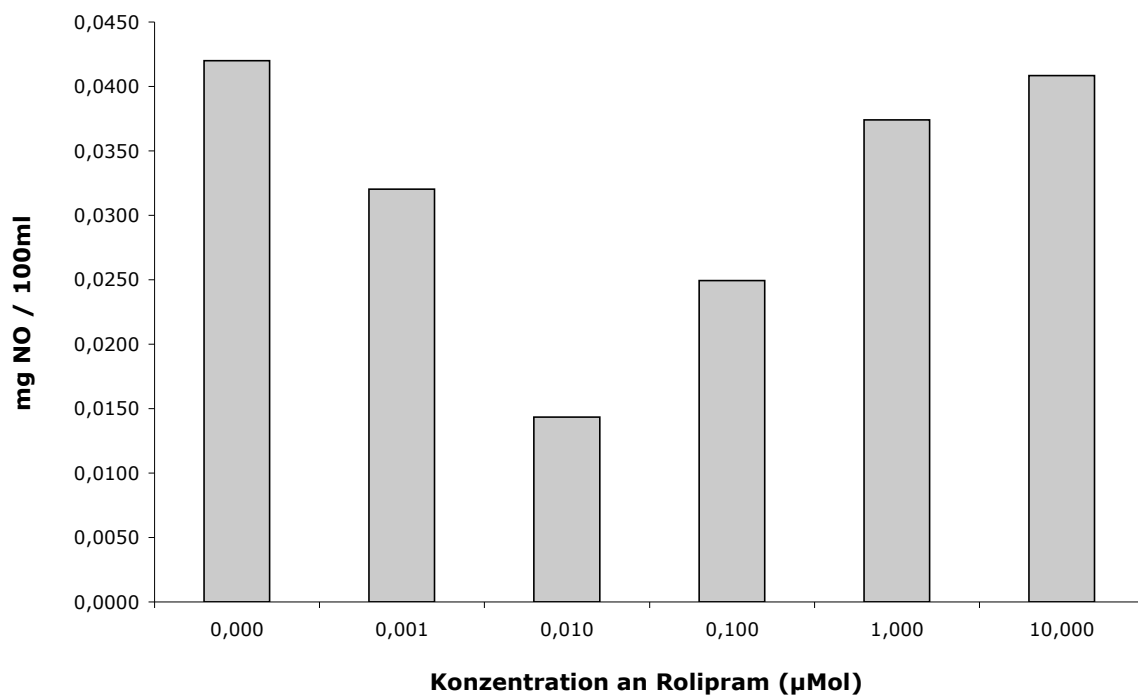


Abb.21: Konzentration an NO im Kulturüberstand von Rattensynoviozyten nach Stimulation mit Lipopolysaccharid und Interferon- γ unter Einfluss von Rolipram; Messung mittels NO-Test

Für die bei der Rheumatoiden Arthritis typische Selbstunterhaltung der synovialen Entzündungsreaktion ist die Zytokinproduktion der Synoviozyten sehr bedeutend. Es soll daher untersucht werden, ob der Phosphodiesteraseinhibitor Rolipram einen Einfluss auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α hat.

Da der ELISA spezifisch für murines IL-6 ist, wurde die Konzentration des von den LPS/IFN- γ -stimulierten Synoviozyten produzierten Ratten-IL-6 im Bioassay bestimmt. Bereits ab einer Konzentration von 0,001 μ Mol Rolipram in der Zellkultur trat eine deutliche Hemmung der Sekretion dieses Zytokins ein. Der Zusammenhang war signifikant (Abb.22).

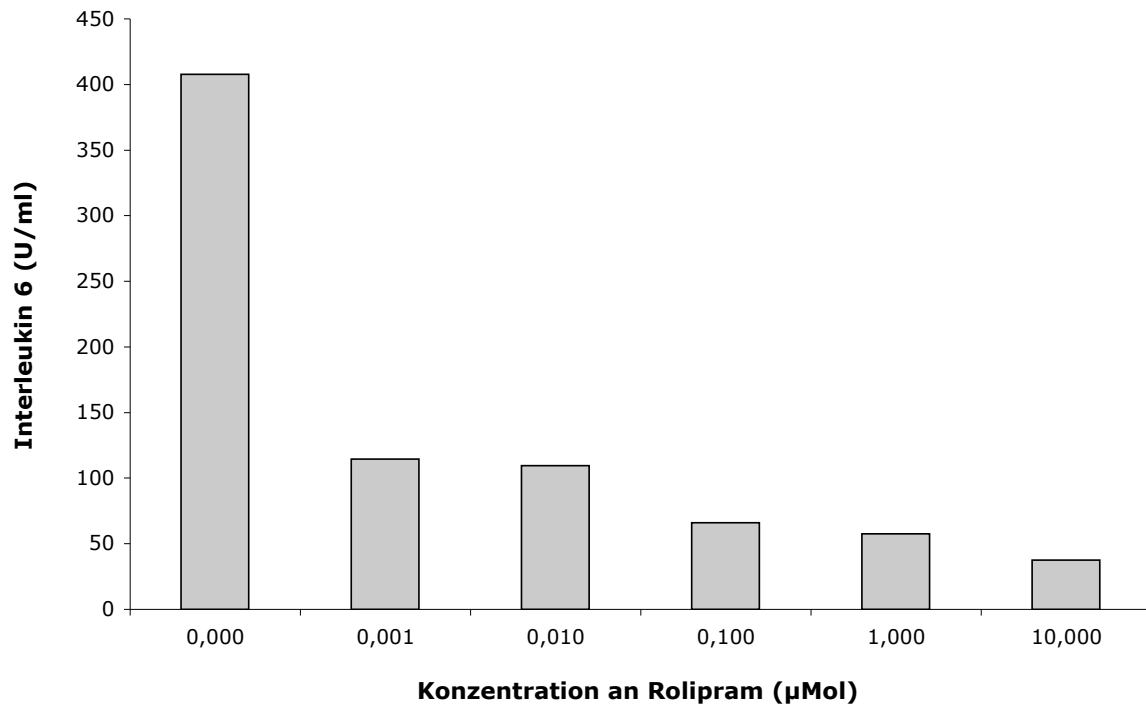


Abb.22: Konzentration an Interleukin 6 im Kulturbedstand von Rattensynoviozyten nach Stimulation mit Lipopolysaccharid und Interferon γ unter Einfluss von Rolipram; Messung mittels Bioassay, die Korrelation zwischen IL-6-Konzentration und Rolipramkonzentration ist signifikant: $p < 0,05$ (Spearman)

Als weiteres wichtiges Zytokin wurde die TNF- α -Sekretion durch die stimulierten und mit dem Phosphodiesteraseinhibitor behandelten Synoviozyten mittels ELISA untersucht. Es zeigte sich auch hier eine signifikante Inhibition der TNF- α -Produktion bereits ab $0,0001 \mu\text{Mol}$ des Inhibitors im Kulturanatz (Abb.23).

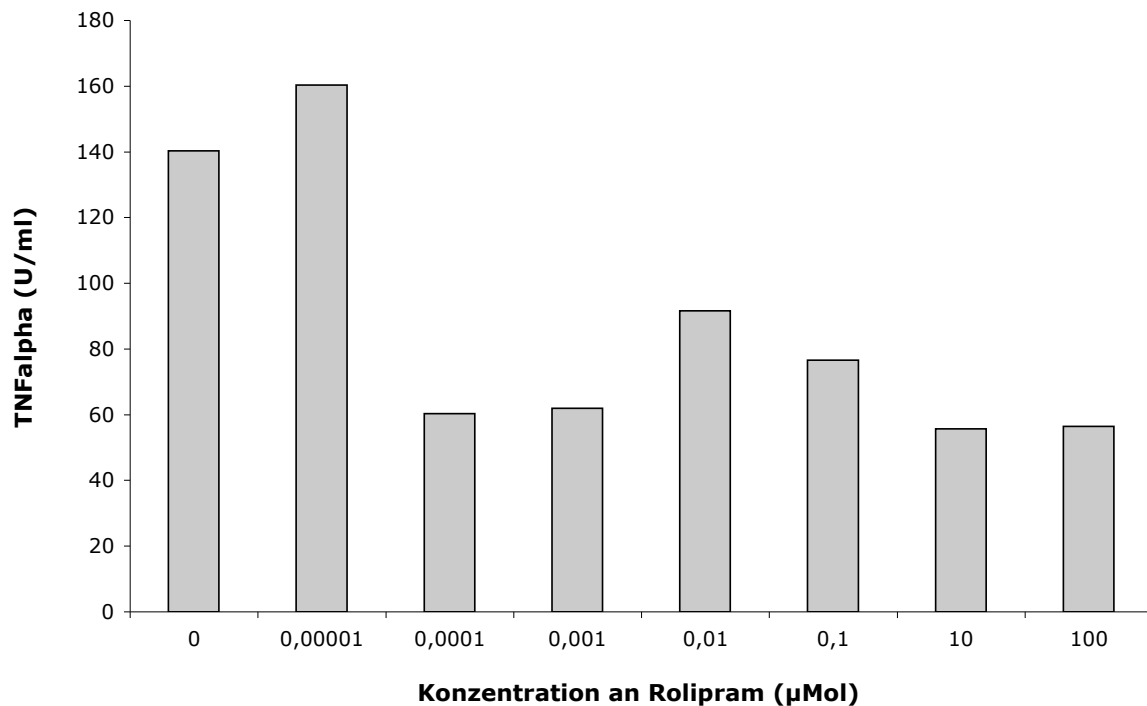


Abb.23: Konzentration an TNF- α im Kulturüberstand von Rattensynoviozyten nach Stimulation mit Lipopolysaccharid und Interferon γ unter Therapie mit Rolipram; Messung mittels ELISA; die Korrelation zwischen IL-6-Konzentration und Rolipramkonzentration ist signifikant: $p < 0,05$ (Spearman)

Zusammenfassend sieht man eine deutliche Hemmung der NO-Synthese bei Inkubation mit niedrigen und mittleren Konzentrationen des Phosphodiesteraseinhibitors sowie eine signifikante Reduktion der Produktion von IL-6 und TNF- α durch die Synoviozyten unter Einfluss von Rolipram.

6. Diskussion

Die Rheumatoide Arthritis des Menschen ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung, die durch destruktive Prozesse zur Gewebeschädigung im Bereich der Gelenke sowie anderer Körpergewebe führt.

Für die Behandlung dieser Erkrankung wurden verschiedene therapeutische Ansätze entsprechend der ätiopathogenetischen Vorstellung entwickelt. Die zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen der Erkrankung sind, trotz umfangreicher Forschung auf diesem Gebiet und einer Reihe vielversprechender Ergebnisse, jedoch noch weitgehend unverstanden. Man geht heute davon aus, dass der Erkrankung ein autoimmunologischer Entzündungsvorgang zugrunde liegt, an dessen Entstehung und Erhaltung verschiedene Zelltypen Anteil haben. Insbesondere autoreaktive T-Zellen sind dabei in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des Interesses gerückt.

Aus Ergebnissen verschiedener tierexperimenteller und in-vitro-Untersuchungen ist bekannt, dass viele immunologische Reaktionen entscheidend durch die intrazelluläre Konzentration von so genannten „second Messengern“, insbesondere cAMP reguliert werden.

Die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP binden an die Proteinkinasen PKA und PKB, was zu einer Aktivierung dieser Enzyme führt. Dadurch werden verschiedene intrazelluläre Proteine phosphoryliert. Auf diesem Wege kann eine große Zahl unterschiedlicher Stoffwechselprozesse in der Zelle reguliert werden. Die intrazelluläre Konzentration der zyklischen Nukleotide wird durch ein Gleichgewicht von Aufbau und Abbau reguliert. Für die Synthese von cAMP zeichnen Adenylatzyklasten, für den Aufbau von cGMP Guanylatzyklasten verantwortlich. Der Abbau der zyklischen Nukleotide in ihre 5'-Monophosphate AMP und GMP erfolgt durch Phosphodiesterasen. Diese Enzyme können in 11 Familien unterteilt werden. Zu jeder Phosphodiesterase-Isoenzymfamilie gehören verschiedene Subtypen und Splicing-Varianten (Beavo, 1995; Burnouf and Pruniaux, 2002; Manganiello et al., 1995; Soderling and Beavo, 2000). Das prädominante Isoenzym in den Zellen des Immunsystems sowie in der glatten Muskulatur der Atemwege ist PDE IV, eine cAMP-spezifische Phosphodiesterase. Phosphodiesterasen vom Typ IV findet man aber auch in Zellen des zentralen Nervensystemes. Die PDE IV-Familie umfasst die Isoenzymsubtypen PDE IV-A bis PDE IV-D, die jeweils einen eigenen Genlocus aufweisen. Durch alternatives Splicing kommt es zur Entstehung mehrerer Splicingvarianten, die aus einer hochkonservierten katalytischen Domäne und zwei n-terminalen Zusatzregionen UCR-1

(upstream conserved region) und UCR-2 bestehen. Insbesondere die Isoformen PDE IV-A, PDE IV-B und PDE IV-D kommen in den Zellen des Immunsystems vor (Burnouf and Pruniaux, 2002).

Um in diesen Regelkreis einzugreifen, bietet sich der Einsatz spezifischer Phosphodiesterase-Inhibitoren an, die insbesondere auf das Isoenzym IV und damit spezifisch auf die Zellen des Immunsystems wirken (Beavo and Reifsnnyder, 1990; Ichimura and Kase, 1993). Als Prototyp dieser Stoffklasse hat sich Rolipram bewährt. Dieses Medikament erhöht die intrazelluläre Konzentration an cAMP (Davis, 1984) und hat eine hierüber vermittelte antiinflammatorische Wirkung (Dyke and Montana, 2002). Es hat in verschiedenen Tiermodellen von Autoimmunerkrankungen seine klinische Wirksamkeit bewiesen (Francischi et al., 2000; Laemont et al., 1999; Nyman et al., 1997; Ross et al., 1997; Williams et al., 1999).

T-Lymphozyten, die eine Schlüsselrolle in der Steuerung der Immunantwort innehaben, exprimieren neben PDE IV auch die Isoenzyme I, III, V und VII der Phosphodiesterase. Dabei besteht kein Unterschied in der Isoenzymverteilung zwischen CD4-positiven T-Helferzellen und CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen. Beide Zellpopulationen exprimieren vor allem PDE IV-A, PDE IV-B und PDE IV-D. Unterschiede bestehen jedoch in der Expression der Phosphodiesterase-Isoenzym-Subklassen zwischen Th1 und Th2-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass in Th1-Zellen die Genexpression für die Isoform PDE IV-C verringert ist und für PDE IV-D fehlt (Essayan et al., 1997). Der Einsatz von Phosphodiesterase-Inhibitoren führt zu einer Hemmung der antigeninduzierten TNF- α -Synthese und Proliferation von T-Zellen, was insbesondere durch die PDE IV-Isoenzyme PDE IV-A und PDE IV-B vermittelt wird (Manning et al., 1999). Die Produktion von IL-2, IL-4, IL-5 und IFN- γ wird durch Behandlung mit selektiven Inhibitoren der Phosphodiesterase IV gehemmt (Barnette et al., 1998; Burnouf and Pruniaux, 2002; Ross et al., 1997).

Der Einfluss einer Therapie mit Phosphodiesterase IV-inhibitoren auf B-Lymphozyten ist dagegen noch weitgehend ungeklärt. B-Lymphozyten enthalten vor allem die Isoenzyme PDE-III und PDE IV (Burnouf and Pruniaux, 2002; Sheth et al., 1997).

Eine wichtige Rolle im Immunsystem nehmen Monozyten und Makrophagen ein. In beiden Zellpopulationen ist das Phosphodiesterase-Isoenzym IV vorherrschend. Im Rahmen der Ausdifferenzierung der Monozyten zu Makrophagen wird die PDE-II-Aktivität gesteigert und die Isoenzyme I und V treten hinzu (Gantner et al., 1997). Unter Stimulation mit LPS ist eine Induktion des PDE IV-B-Genes in humanen Monozyten sichtbar. Diese Induktion kann durch IL-10 inhibiert werden (Wang et al., 1999). Eine Therapie mit Phosphodiesterase IV-Inhibitoren führt vor allem zu einer drastischen Senkung der Produktion des

proinflammatorischen Zytokins TNF- α durch Monozyten/Makrophagen (Barnette et al., 1998; Manning et al., 1999).

Epithelzellen kommt im Entzündungsgeschehen eine wichtige Rolle als Liberatoren proinflammatorischer Zytokine zu. Zitnik et al. (1993) fanden beispielsweise eine Inhibition der IL-6-Sekretion humaner Fibroblasten nach Behandlung mit cAMP-steigernden Agenzien.

6.1. Klinische Effekte von Phosphodiesterase IV-Inhibitoren auf die Antigen-induzierte Arthritis der Maus

In verschiedenen Studien ist die Wirksamkeit von Phosphodiesterase-Inhibitoren auf die klinische Krankheitsaktivität in unterschiedlichen Tiermodellen der Rheumatoiden Arthritis dokumentiert worden. So zeigten Nyman et al. (1997) im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis der Ratte eine Verringerung der klinischen Ausprägung der Arthritis unter Therapie mit 2 mg/kg Rolipram, subkutan verabreicht. Ebenso stellten Francischi et al. (2000) eine Verringerung des Pfotenödemes und der Hyperalgesie von Ratten mit Adjuvans-induzierter Arthritis unter Rolipramtherapie dar. Für die Streptokokkenzellwand-induzierte Arthritis konnte analog eine Reduktion der Pfotenschwellung durch den Einsatz von Rolipram als spezifischer Phosphodiesterase IV-Inhibitor gezeigt werden (Laemont et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit sollte im Modell der antigeninduzierten Arthritis der Maus zunächst die wirksame Dosis an Rolipram gefunden werden. Als klinischer Parameter der Arthritisaktivität diente die Messung der Kniegelenkschwellung. Hierzu hatten Ross et al. (1997) im Modell der Kollageninduzierten Arthritis der Maus eine Dosis von 5mg/kg Körpergewicht als ausreichend für die signifikante klinische Reduktion der Ausprägung der Arthritis bestimmt. Eine Dosiserhöhung auf 10mg/kg Körpergewicht brachte klinisch nur einen marginalen Effekt, allerdings konnte histologisch eine ausgeprägtere Reduktion der Knorpel- und Knochendestruktion gezeigt werden.

In unserem Ansatz erwies sich eine tägliche Dosis von 2,5mg/kg Körpergewicht ab Tag 0 als sichtbar, jedoch nicht signifikant klinisch wirksam. Erst eine Dosis von 10mg/kg Körpergewicht erzielte eine statistisch signifikante Reduktion der Kniegelenkschwellung der behandelten Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe.

Im Rahmen eines möglichen Einsatzes von Phosphodiesterase-Inhibitoren in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis des Menschen wäre auch ein präventiver Ansatz zur Verhinderung bzw. Dämpfung eines Krankheitsschubes wünschenswert. Daher erfolgte in einer weiteren Tierversuchsreihe die Administration von Rolipram in einer Dosierung von 10 mg/kg

Körpergewicht bereits ab dem Tag 14 vor Arthritisinduktion bis zum Studienende am Tag 21. Es zeigte sich, dass gegenüber der erst ab dem Zeitpunkt der Arthritisinduktion behandelten Gruppe eine fast vollständige Inhibition der Schwellung in den ersten 3 Tagen nach Arthritisinduktion eintritt.

In einer Studie am Modell der Kollagen-induzierten Arthritis der Ratte wurde demgegenüber für eine präventive Therapie mit Rolipram nur eine Verzögerung des Arthritiseintrittes, keine Reduktion der klinischen Ausprägung beobachtet (Nyman et al., 1997). Allerdings wurde in diesem Ansatz Rolipram nur bis zum Zeitpunkt der erwarteten Arthritisentwicklung, nicht darüber hinaus verabreicht. Ausgehend von den tierexperimentellen Beobachtungen könnte es also möglich sein, durch eine präventive Verabreichung eines spezifischen Phosphodiesterase IV-Inhibitors das Auftreten eines Schubes der Rheumatoiden Arthritis hinauszuzögern, bei fortgesetzter Einnahme auch vollständig zu verhindern.

Da in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis T-Lymphozyten eine zentrale Rolle spielen, wurden schon früh Therapieversuche mit monoklonalen Antikörpern gegen den T-Zell-Rezeptor CD4 durchgeführt. In klinischen Studien an Patienten mit Rheumatoider Arthritis zeigten sich depletierende anti-CD4-Antikörper als klinisch wirksam (Choy et al., 1996). Nissler et al. (2004) konnten die klinische Wirksamkeit des depletierenden monoklonalen anti-CD4-Antikörpers GK1.5 im Tiermodell der Antigen-induzierten Arthritis der Maus dokumentieren. Es konnte eine signifikante Verringerung der Knieschwellung in der akuten und frühen chronischen Phase der Erkrankung unter Therapie mit GK1.5 gezeigt werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen untersuchten wir in einer weiteren Versuchsserie die kombinierte Therapie mit dem Phosphodiesteraseinhibitor Rolipram und dem anti-CD4-Antikörper GK1.5, um möglicherweise einen additiven Effekt zu erzielen. Der bereits von Nissler et al. (2004) beschriebenen Effekt einer Monotherapie mit dem anti-CD4-Antikörper GK 1.5, die Verringerung der Arthritisaktivität in der akuten und frühen chronischen Phase, konnte bestätigt werden. Außerdem zeigte sich ein signifikanter additiver Effekt der Kombinationstherapie von Rolipram in der Dosierung 10mg/kg Körpergewicht und dem monoklonalen anti-CD4-Antikörper GK 1.5. Es kam zu einer Verstärkung der Inhibition der Kniegelenkschwellung sowohl in der akuten als auch in der frühen chronischen Phase der antigeninduzierten Arthritis der Maus.

Zur Erfassung der zellulären Immunität wurde in diesem Ansatz der Maus-Ohr-Test, modifiziert nach Farmer et al. (1986) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von Rolipram in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht eine ebenso signifikante Inhibition der T-Zell-Reaktion hervorruft wie die Verwendung des monoklonalen

anti-CD4-Antikörpers GK1.5. Bei kombinierter Therapie mit Rolipram und dem Antikörper ließ sich ein additiver Effekt nachweisen, der jedoch nicht statistisch signifikant war.

In den klinischen Studien an Patienten mit Rheumatoider Arthritis wurden zunächst ausschließlich depletierende anti-CD4-Antikörper eingesetzt (Choy et al., 1996). Man stellte jedoch fest, dass depletierende anti-CD4-Antikörper in Dosen verabreicht, die zu einer ausreichenden Akkumulation in der Synovialflüssigkeit führen, um damit eine klinische Verbesserung der Rheumatoiden Arthritis zu bewirken, auch eine ausgeprägte Lymphopenie im peripheren Blut auslösen, die ihrerseits eine nicht akzeptable allgemeine Immunsuppression bewirkt (Choy et al., 1998). Man geht daher gegenwärtig dazu über, nicht-depletierende monoklonale anti-CD4-Antikörper einzusetzen. Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass schon die einmalige Verabreichung eines nicht-depletierenden anti-CD4-Antikörpers ausreicht, um die Ausbildung der Streptokokkenzellwand-induzierten Arthritis der Ratte zu verhindern und eine Resistenz gegenüber der Entwicklung dieser Erkrankung zu erzeugen. Man erklärt diesen Effekt mit der Entstehung einer immunologischen Toleranz (Choy et al., 1998; Van den Broek et al., 1992). Interessant wäre daher auch eine Kombinationstherapie selektiver Phosphodiesterase-Inhibitoren mit nicht-depletierenden anti-CD4-Antikörpern.

Rp73401, Piclamilast, wurde in verschiedenen Studien als signifikant wirksamerer Entzündungsinhibitor beschrieben als Rolipram. So fanden Bundschuh et al. (2001) eine fast vier mal höhere Efficacy für Piclamilast (ED(50) $8,3\mu\text{mol/kg}$) verglichen mit Rolipram (ED(50) $32,5\mu\text{mol/kg}$) bezüglich der inhibitorischen Wirkung auf frühe allergeninduzierte Bronchokonstriktion und Entzündungsreaktion der oberen Atemwege bei Ratten und Meerschweinchen. Aus diesem Grunde entschlossen wir uns zur Verwendung einer Dosis von $2,5\text{mg Piclamilast/kg}$ Körpergewicht im Therapieversuch am Tiermodell der murinen antigeninduzierten Arthritis. In dieser Dosierung zeigte Piclamilast zwar eine deutliche Senkung der klinischen Arthritisaktivität (Kniegelenkschwellung) sowie der T-Zell-Aktivität in vivo (DTH-Reaktion) gegenüber der Vehicelgruppe, der Effekt war jedoch signifikant schwächer, verglichen mit Rolipram in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht. Dies unterstützt die Beobachtungen von Cho et al. (2004), die für das Modell der Adjuvans-Arthritis der Ratte keine signifikante Reduktion der Pfotenschwellung durch Therapie mit RP73401 (Piclamilast) zeigen konnten. Demgegenüber zeigte Indometazin, ein Cyclooxygenasehemmer und seit langem eingesetztes Medikament in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis, im selben Versuchsansatz eine signifikant bessere Reduktion der klinischen Arthritisaktivität. Dies könnte auf eine bekannterweise schlechte Pharmakokinetik von Piclamilast in vivo zurückzuführen sein (Burnouf and Pruniaux, 2002).

6.2. Einfluss auf die histologische Entzündungsreaktion und Gelenkdestruktion

Entscheidend für die Prognose der Rheumatoiden Arthritis bezüglich ihres Langzeitverlaufes ist die histologisch nachweisbare Entzündungsreaktion an der Synovialmembran mit zellulärem Infiltrat, die Ausbildung eines infiltrativen Pannusgewebes sowie schließlich die Destruktion von Knorpel- und Knochenstrukturen als Endpunkt der entzündlichen Vorgänge im Gelenk. Die Hemmung dieser histologischen Veränderungen ist daher ein entscheidendes Ziel jeder Therapie der Rheumatoiden Arthritis.

Auch diesbezüglich konnte in verschiedenen Studien eine deutliche protektive Wirkung der Therapie mit Phosphodiesterase IV-Inhibitoren in Tiermodellen nachgewiesen werden. Ross et al. (1997) konnten im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis der Maus eine Reduktion der histologisch nachweisbaren Knorpel- und Knochendestruktion um 21% durch eine Therapie mit 5mg Rolipram/kg Körpergewicht sowie eine Reduktion um 49% nach Therapie mit einer Dosierung von 10mg Rolipram/kg Körpergewicht nachweisen. Im Modell der Adjuvans-Arthritis der Ratte konnte eine signifikante Verringerung des Entzündungsinfiltrates sowie der Knorpel- und Knochendestruktion unter Therapie mit dem selektiven Phosphodiesterase IV-Inhibitor Rolipram an den Tagen 7, 14 und 21 nach Arthritisinduktion beobachtet werden (Francischi et al., 2000). Auch Laemont et al. (1999) fanden am Modell der Streptokokkenzellwand-induzierten Arthritis der Ratte eine signifikante Verringerung der histologisch nachweisbaren synovialen Entzündungsreaktion.

In der vorliegenden Arbeit wurden die histologischen Veränderungen durch einen Arthritiscore quantifiziert. Dieser setzt sich aus der Pannusbildung, dem zellulären Entzündungsinfiltrat, den Veränderungen der Synovialmembran sowie der Knorpel- und Knochenschädigung zusammen. Es zeigte sich für eine Roliprambehandlung in Konzentrationen von 2,5mg/kg Körpergewicht und 10mg/kg Körpergewicht ab dem Tag der Arthritisinduktion eine signifikante Reduktion der Entzündungsreaktion sowie der Knorpel- und Knochendestruktion gegenüber der Kontrollgruppe. Für die mit 2,5mg Rolipram/kg Körpergewicht therapierten Tiere lässt sich dabei kein signifikanter Unterschied gegenüber den Therapiegruppen mit höherer Konzentration des Inhibitors nachweisen.

Ebenso konnte für präventive Verabreichung von Rolipram, ab 14 Tage vor Arthritisauslösung täglich in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht, gezeigt werden, dass eine signifikante Verringerung der histologischen Arthritismerkmale eingetreten ist. Dabei unterscheiden sich die Werte des Arthritiscore jedoch nicht von der erst ab dem Tag der Arthritisauslösung therapierten Gruppe. In diesem Zusammenhang muss jedoch

darauf hingewiesen werden, dass der Zeitpunkt der histologischen Beurteilung am Tag 21 in der chronischen Phase des Arthritismodelles liegt und somit die möglicherweise differenten Effekte in der akuten Phase nicht erfasst werden können. Auch die Therapie mit dem anti-CD4-Antikörper GK1.5 allein bzw. in Kombination mit Rolipram in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht führte zu einer signifikanten Senkung des Arthritiscores als Ausdruck der histologischen Gelenkschädigung durch die Arthritis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der klinisch beobachtete additive Effekt einer Behandlung mit dem anti-CD4-Antikörper GK1.5 zusätzlich zur Rolipramtherapie bildet sich jedoch histologisch nicht deutlich ab. Zwar ist ein Trend der geringeren Ausprägung von Mesothelabnormitäten und zellulärem Infiltrat erkennbar, die sich rechnerisch auch im gesamthistologischen Index niederschlägt, jedoch sind diese Unterschiede nicht statistisch signifikant.

6.3. Einfluss auf das Zytokinmilieu im entzündeten Gelenk

Zytokine spielen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis eine Schlüsselrolle. Es ist bekannt, dass die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α sowohl im Falle der humanen Rheumatoiden Arthritis als auch in verschiedenen Tiermodellen proinflammatorisch auf die Synovitis sowie die Knorpeldestruktion wirken können (Arend, 2001; Choy et al., 2002; Feldmann et al., 1996; Harris, 1990; Sasai et al., 1999). Dabei können IL-1 β und TNF- α die Sekretion von IL-6 durch die Synoviozyten triggern und umgekehrt wirkt eine anti-TNF- α -Behandlung supprimierend auf die IL-6-Produktion (Charles et al., 1999; Feldmann et al., 1996). Im Modell der CD4(+)-vermittelten SKG-Arthritis der Maus ließ sich zeigen, dass die im arthritischen Gelenk nachweisbaren Zytokine neben Makrophagen und dendritischen Zellen zu einem großen Teil von Synoviozyten hergestellt werden. So wird IL-6 zu einem großen Teil von den synovialen Stromazellen, den fibroblastenartigen Synoviozyten (FLS) gebildet. Demgegenüber werden IL-1 β und TNF- α vor allem in der superfiziellen Deckzellschicht der Synovialmembran gebildet (Hata et al., 2004). Im Modell der SKG-Arthritis der Maus konnte festgestellt werden, dass IL-6-defiziente Tiere keine Arthritis ausbilden konnten, eine TNF- α -Defizienz hingegen verzögerte ebenso wie IL-1-Defizienz zwar den Beginn der Arthritis und senkte Inzidenz und Schwere der Erkrankung, konnte jedoch den Ausbruch der Arthritis nicht vollständig verhindern. Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch TNF- α -unabhängige, proinflammatorische Mechanismen in der Pathogenese dieser Arthritis wirksam sein müssen (Hata et al., 2004). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass nur etwa 30-40% der RA-Patienten deutlich auf den Einsatz von TNF- α -Inhibitoren reagieren (Feldmann and Maini, 2001).

In der Gelenkflüssigkeit von RA-Patienten fanden sich stark erhöhte Level von IL-6 (Hirano et al., 1988). Insbesondere Patienten mit hohen Rheumafaktortitern, die häufig einen primär polyarthritischen und insgesamt schwereren Verlauf der Erkrankung zeigen, weisen eine erhöhte Konzentration von IL-6 auf (Bhardwaj et al., 1988; Hirano et al., 1988; Houssiau et al., 1988). Ebenso lässt sich eine Korrelation von erhöhten IL-6-Serumkonzentrationen und dem vermehrten Auftreten von Akutphaseproteinen im Serum von RA-Patienten finden (Houssiau et al., 1988). Für die juvenile chronische Arthritis ist außerdem gezeigt worden, dass erhöhte Serumlevel von IL-6 mit einer verstärkten Ausprägung der Gelenkdestruktion einhergehen (de Benedetti et al., 1991). Die Bedeutung von IL-6 als zentrales proinflammatorisches Zytokin im Pathogenesemechanismus unterstreichen die Untersuchungen an IL-6-defizienten Mäusen in verschiedenen Tiermodellen. So konnten Alonzi et al. (1998) zeigen, dass IL-6 die Entwicklung der Kollageninduzierten Arthritis (CIA) in DBA1/J-Mäusen vollkommen verhinderte, ebenso wie Hata et al. (2004) im Modell der SKG-Maus. Demgegenüber sahen Sasai et al. (1999) einen verzögerten Beginn und eine mildere Ausprägung der Kollageninduzierten Arthritis bei IL-6-defizienten Mäusen, zeigten jedoch, dass das Vorhandensein von IL-6 nicht zwingend notwendig für die Entwicklung einer Arthritis ist. Interessanterweise zeigte sich in dieser Studie ein Shift der T-Zell-Antwort zur Th2-Reaktion, was sich in einer vermehrten Produktion von IL-4 und IL-10 manifestierte. Es liegt also nahe, dass IL-6 auch einen Einfluss auf die T-zelluläre Immunantwort hat. Ohshima et al. (1998) konnten diese Ergebnisse durch die Beobachtung ergänzen, dass die Knorpelzerstörung im Rahmen der antigeninduzierten Arthritis in IL-6-defizienten Mäusen milder ausfiel als in den Wildtypkontrollen. Auch in dieser Studie konnte ein Überwiegen der Th2-Reaktion in antigen- oder mitogenstimulierten Lymphozytenkulturen IL-6-defizienter Tiere gezeigt werden. In anderen murinen Arthritismodellen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden: im Modell der passiven Immunkomplex-induzierten Arthritis ließ sich ebensowenig eine Auswirkung der IL-6-Defizienz auf die Schwere des Krankheitsbildes nachweisen wie im Modell der Arthritis TNF- α -transgener Mäuse (Alonzi et al., 1998; de Hooge et al., 2000).

Zytokine sind jedoch nicht nur wegen ihrer proinflammatorischen Wirkung von Bedeutung. IL-10 zeigte in verschiedenen Studien eine supprimierende Wirkung auf die Produktion von TNF- α und IL-6 durch Makrophagen und Synoviozyten (Katsikis et al., 1994; Persson et al., 1996; Walmsley et al., 1996). Für andere entzündliche Autoimmunerkrankungen konnte gezeigt werden, dass IL-10 in der Lage ist, die Immunmodulation durch CD25+CD4+ Zellen, so genannte regulatorische T-Zellen, positiv zu beeinflussen (Asseman et al., 1999; Goudy et al., 2003). Eine IL-10-Defizienz kann im Modell der CD4+-vermittelten SKG-Arthritis der

Maus einen erheblich stärkeren Ausbruch der Rheumatoiden Arthritis hervorrufen als in IL-10-kompetenten Tieren. Man könnte also vermuten, dass das Fehlen von IL-10 die T-Zell-vermittelte Hemmung der arthritogenen, autoreaktiven T-Zellen abschwächt (Hata et al., 2004). Neben lokalen und systemischen antiinflammatorischen Effekten (Hata et al., 2004; Naka et al., 2002) konnte ebenso gezeigt werden, dass IL-6 die immunsupprimierende Wirkung von CD25+CD4+T-Zellen auf andere T-Lymphozyten abschwächen kann (Pasare and Medzhitov, 2003).

Ausgehend von diesen Betrachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit für die Betrachtung des Zytokinspektrums von Makrophagen $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-1 β als proinflammatorische Zytokine sowie IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin bestimmt. Synoviale Fibroblasten sezernieren unter anderem IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ als proinflammatorische Zytokine. Diese dienen in der vorliegenden Arbeit als Marker für die proinflammatorische Aktivität der synovialen Fibroblasten.

6.3.1. Makrophagen

Das Zytokinmuster im arthritischen Gelenk wird wesentlich durch die Sekretion von Makrophagen und dendritischen Zellen bestimmt. Insbesondere die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-1 β erfahren eine massive Überproduktion im arthritischen Gelenk und sind maßgeblich am Pathogeneseprozess der Rheumatoiden Arthritis beteiligt.

Die genauen Mechanismen der Makrophagenaktivierung sind bis heute noch nicht ausreichend verstanden. Eine Möglichkeit der Aktivierung von Makrophagen stellt der Zell-Zell-Kontakt mit aktivierten T-Lymphozyten dar, der zu einer verstärkten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 β führt. Dabei wurde gefunden, dass die Aktivierung von Monozyten durch Th1-Zellen zu einer vermehrten Produktion von IL-1 β führt, während eine Monozytenaktivierung durch Th2-Zellen vor allem zur Produktion des IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1RA) führt (Chizzolini et al., 1997). Vielfältige Kontrollmechanismen stellen unter in-vivo-Bedingungen sicher, dass es nicht zu einem systemischen Zytokinfreisetzungssyndrom kommt. Ein solches inhibitorisches Serumprotein ist Apolipoprotein AP-1, ein so genanntes negatives Akutphaseprotein. Dieser Faktor ist bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis deutlich reduziert (Rossol et al., 2005). Eine weitere Aktivierungsmöglichkeit stellt die Bindung von Superantigenen, beispielsweise bakteriellen Zellwandbestandteilen wie das Lipopolysaccharid (LPS), an Toll-like-Rezeptoren der Makrophagen dar (Jin et al., 2005). Diese Superantigene werden als „pathogene-associated molecular pattern“ (PAMP) bezeichnet.

In verschiedenen Studien wurde dargelegt, dass eine Anhebung des intrazellulären cAMP zu einer Verringerung der Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen führt. Durch eine intrazelluläre Anhebung des cAMP werden cAMP-abhängige Proteinkinasen A aktiviert, was zu einer Phosphorylierung von Zielproteinen wie etwa cAMP-responsive-elements (CRE) Bindungsproteinen führt. Diese stellen Transkriptionsfaktoren dar, die an spezifische Sequenzen der Promotorregion verschiedener Gene binden (Eigler et al., 2001). Beispielsweise wurde eine entsprechende CRE-spezifische Sequenz in der 5'-flankierenden Region des TNF-Genes beschrieben (Lalli and Sassone-Corsi, 1994).

Greten et al. (1995) konnten zeigen, dass eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung durch Behandlung der mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten murinen Makrophagenzelllinie RAW 264.7 mit dem selektiven Phosphodiesteraseinhibitor Rolipram zu einer Suppression des produzierten TNF- α auf weniger als 30% des Ausgangswertes führt. Ebenso wurde beobachtet, dass eine Vorbehandlung mit Rolipram in einer Kultur muriner Peritonealmakrophagen eine Senkung der Konzentration von TNF- α und IL-6 bedingt (Kambayashi et al., 1995). In einer weiteren Studie wurde ein ähnlicher Effekt auf mit Lipopolysaccharid und Interferon- γ stimulierte Knochenmarksmakrophagen im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis der Maus beobachtet, der Zusatz von Rolipram führte zu einer Suppression der TNF- α und IL-12-Produktion (Ross et al., 1997). Diese antiinflammatorische Wirkung der cAMP-Erhöhung auf LPS-stimulierte Makrophagen durch die Blockade der Phosphodiesterase IV wird über das Proteinkinase A-System vermittelt und ist an die Expression eines der drei murinen Phosphodiesterase IV-Genen, PDE IV-B gebunden (Jin et al., 2005).

In unseren Untersuchungen konnten wir eine deutliche, dosisabhängige Suppression der TNF- α -Produktion von kultivierten und mit Lipopolysaccharid und Interferon- γ stimulierten murinen Peritonealmakrophagen unter Rolipram-Zusatz beobachten. Allerdings verringerte sich dieser Effekt bei sehr hohen Dosen von Rolipram (1 bis 10 μ Mol) im Kulturansatz. Möglicherweise treten bei unphysiologisch hohen Dosen des Phosphodiesterase-Inhibitors toxische Effekte oder weitere Regulationsvorgänge in den Vordergrund, die bislang jedoch noch nicht ausreichend untersucht wurden. In vivo dürften jedoch diese sehr hohen Konzentrationen nicht erreicht werden, was durch die klinische Wirksamkeit der Substanz in den oben genannten Therapiestudien unterstrichen wird. Weiterhin existieren Hinweise darauf, dass auch TNF- α -unabhängige, proinflammatorische Mechanismen in der Pathogenese dieser Arthritis wirksam sein müssen (Hata et al., 2004). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass nur etwa 30-40% der RA-Patienten deutlich auf den Einsatz von TNF- α -Inhibitoren reagieren (Feldmann and Maini, 2001).

Man nimmt an, dass die Reduktion der Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 durch eine Erhöhung des antiinflammatorischen IL-10 bedingt wird. Dafür spricht, dass in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass der TNF- α -supprimierende Effekt von Rolipram zumindest signifikant, wenngleich nicht komplett sowie der IL-6-supprimierende Effekt vollständig durch die Zugabe eines Anti-IL-10-Antikörpers aufgehoben werden kann (Kambayashi et al., 1995). Auch in unserem Ansatz war eine signifikante Steigerung der IL-10-Konzentration in der murinen Peritonealmakrophagenkultur durch den Einsatz von Rolipram nachweisbar.

Bisher besteht Uneinigkeit über den zellulären Mechanismus der Beeinflussung der Zytokinsekretion durch die intrazelluläre cAMP-Erhöhung. Kambayashi et al. (1995) konnten in der Peritonealmakrophagenkultur mittels Polymerasekettenreaktion zwar eine Erhöhung der Menge an IL-10-mRNA, jedoch keine Veränderungen in der Menge an produzierter TNF- α -mRNA nachweisen. In anderen Studien gelang der Nachweis einer Reduktion der TNF- α -mRNA-Level in stimulierten Makrophagenkulturen durch die Anhebung des intrazellulären cAMP, was eine Regulation der TNF- α -Produktion auf dem Transkriptionslevel nahelegt (Taffet et al., 1989; Tannenbaum and Hamilton, 1989). Man geht daher heute davon aus, dass die intrazelluläre Anhebung des cAMP-Levels durch Phosphodiesterase-Inhibitoren in erster Linie durch eine Regulation der Transkription auf die Zytokinproduktion der Makrophagen einwirkt (Han et al., 1990).

Diese Resultate im murinen System konnten weitgehend für humane Zellen nachvollzogen werden, in einer Studie mit LPS-stimulierten humanen Blutmonozyten konnte eine IL-10-Anhebung und Hemmung der TNF- α -Produktion durch den selektiven Phosphodiesterase IV-Inhibitor Rolipram nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte durch Blockade der Proteinkinase A mittels des stabilen cAMP-Antagonisten (Rp)-cAMPS aufgehoben werden, was dafür spricht, dass die Immunmodulation durch erhöhte intrazelluläre cAMP-Level über das Proteinkinase-A-System vermittelt wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die LPS-induzierte TNF- α -Produktion vor der IL-10-Produktion einsetzt, mithin also nicht durch endogenes IL-10 angeregt wird (Eigler et al., 1998).

An humanen Monozyten konnte in verschiedenen Studien eine Suppression der IL-1 β -Produktion durch die Behandlung mit Rolipram gezeigt werden. Diese Wirkung des PDE IV-Inhibitors war effektiver als nichtselektive Phosphodiesterase-Inhibitoren (Verghese et al., 1995; Yoshimura et al., 1997). Andere Studien fanden in endotoxinstimulierten humanen peripheren Blutmonozyten einen nur marginalen Effekt (Molnar-Kimber et al., 1993) bzw. an Lipopolysaccharid-stimulierten humanen Monozyten keinen Effekt der Behandlung mit

selektiven Phosphodiesterase IV-Inhibitoren auf die Konzentration an IL-1 β (Endres et al., 1991).

Im murinen Modell der antigeninduzierten Arthritis konnten wir ebenfalls keine signifikante Beeinflussung der LPS-stimulierten IL-1 β -Produktion von Peritonealmakrophagen durch eine Zugabe von Rolipram nachweisen. Diese Diskrepanz zwischen reproduzierbarer Beeinflussung der TNF- α -Sekretion durch eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung im Gegensatz zu recht unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Beeinflussung der IL-1 β -Sekretion weist darauf hin, dass die genauen Mechanismen der Modulation dieser Zytokinsekretion noch weitgehend unklar sind. Eine weitere Ursache der teilweise von unseren Daten abweichenden Studienergebnisse bezüglich der IL-1 β -Produktion humaner Monozyten könnte in möglichen Unterschieden in der Stoffwechselregulation humaner Blutmonozyten von murinen Peritonealmakrophagen begründet liegen.

Stickstoffmonoxid (NO) wird von verschiedenen Zellen des Immunsystems, insbesondere von aktivierten Makrophagen produziert und stellt einen allgemeinen Aktivierungsmarker dieser Zellen dar. Darüber hinaus konnte in jüngerer Zeit gezeigt werden, dass NO eine wichtige Rolle bei der Vermittlung verschiedener Aspekte der Immunantwort spielt. Es kann als Antioxidans wirken und beeinflusst die Freisetzung unterschiedlicher Entzündungsmediatoren aus verschiedenen direkt oder indirekt an der Immunantwort beteiligter Zellen, z.B. Leukozyten, Makrophagen, Mastzellen und Endothelzellen. Weiterhin kann NO die Mikrozirkulation beeinflussen, die Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel- eine wichtige Voraussetzung für die Migration dieser Zellen in das entzündete Gewebe- regulieren und ist an der Steuerung verschiedener Enzyme beteiligt (Wallace, 2005). Am Modell der antigeninduzierten Arthritis der Maus wurde gezeigt, dass die Plasmakonzentration von NO sowohl in der akuten als auch der chronischen Phase der Arthritis stark erhöht ist. Für die Produktion dieses Stickstoffmonoxids ist eine induzierbare Nitritoxidase (iNOS) verantwortlich, deren Aktivität im Modell der murinen AIA stark erhöht war. Es zeigte sich, dass eine Hemmung der iNOS durch L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine (L-NIL) in der akuten Phase der AIA eine klinische wie histologische und immunhistologische Verstärkung der Entzündungsreaktion bewirkt. In der chronischen Phase konnten keine Auswirkungen einer Hemmung der NO-Synthese beobachtet werden. Daraus wurde geschlussfolgert, dass NO zumindest in der akuten Phase der antigeninduzierten Arthritis eine protektive Wirkung zeigt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in den letzten Jahren zahlreiche Anstrengungen unternommen, NO-freisetzende Substanzen als antiinflammatorische Therapeutika einzusetzen (Wallace, 2005).

In unserem Modell der antigeninduzierten Arthritis der Maus sollte die Wirkung einer

intrazellulären cAMP-Erhöhung auf die Produktion von NO durch aktivierte Makrophagen analysiert werden. Hierzu wurden murine Peritonealmakrophagen aus arthritischen Mäusen kultiviert und mit Lipopolysaccharid und Interferon- γ stimuliert. Der Effekt einer Zugabe von verschiedenen Dosen des selektiven Phosphodiesteraseinhibitors Rolipram wurde untersucht. Die Produktion an NO wurde durch die Stimulation erwartungsgemäß deutlich verstärkt, es ließ sich jedoch kein signifikanter Effekt der Roliprambehandlung nachweisen. Demgegenüber konnten Greten et al. (1995) an LPS-stimulierten murinen Makrophagen der RAW 264.7-Zelllinie eine Steigerung der NO-Produktion durch Behandlung mit Rolipram beobachten. In einer weiteren Studie an dieser Zelllinie zeigten Beshay et al. (2001) eine deutliche Suppression der NO-Produktion LPS-stimulierter muriner Makrophagen durch Vorbehandlung mit Rolipram. Dabei war die Hemmung der NO-Synthese durch Rolipram über 40x effektiver als durch den nichtselektiven Phosphodiesteraseinhibitor Pentoxifyllin. In derselben Studie konnte auch die NO-Synthese von Staphylokokken-Enterotoxin-B-stimulierten Peritonealmakrophagen in vivo durch die Verabreichung von Rolipram signifikant gehemmt werden. Es wurde gezeigt, dass sowohl Rolipram als auch Pentoxifyllin die induzierbare NO-Synthetase bereits auf mRNA-Level hemmen.

Die Mechanismen, die zu den dargestellten, sehr differenten Ergebnissen über die Beeinflussung der NO-Produktion von Makrophagen durch eine Anhebung des intrazellulären cAMP-Levels führen, sind noch nicht ausreichend bekannt.

6.3.2. Synoviozyten

Synoviozyten sind einerseits direkt in die Ätiologie der Rheumatoiden Arthritis einbezogen und reagieren andererseits als primäre Quelle jener Entzündungsmediatoren, die letztlich zu den histopathologisch fassbaren Gelenkdestruktionen führen.

Die synoviale Intimazellschicht produziert nicht nur den Großteil der Bestandteile der Synovialis, insbesondere Proteoglycane, sondern ernährt auch den Gelenkknorpel. Fibroblastenartige Synoviozyten sind auch für die Matrixumbau- und Zerstörungsvorgänge im rheumatischen Gelenk verantwortlich. Sie produzieren verschiedene matrixdegradierende Enzyme, vor allem Serinproteasen, Kathepsine und Matrixmetalloproteinasen, wie die Protease Stromelysin, die ausschließlich in Typ B-Synoviozyten exprimiert wird (Firestein et al., 1991; Keyszer et al., 1995; McCachren et al., 1990). Gleichmaßen sezernieren sie aber auch natürliche Proteaseinhibitoren, sogenannte „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMP). Im Rheumatoiden Gelenk ist das Verhältnis von MMPs und TIMPs deutlich zu den MMPs hin verschoben (Firestein et al., 1991). Fibroblastenähnliche Synoviozyten sind also in

der Lage, die Matrix aufzubauen oder zu zerstören - in Abhängigkeit vom herrschenden Zytokinmilieu.

Neben eingewanderten T-Zellen und Makrophagen bestimmen die Synoviozyten dieses Zytokinmilieu in der Synovia und der Synovialmembran maßgeblich mit. Makrophagenähnliche Typ A-Synoviozyten und synoviale Makrophagen produzieren TNF- α , IL-1 β , den Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) sowie weitere Chemokine. Fibroblastenähnliche Synoviozyten (FLS) sezernieren IL-6 und angiogenetische Faktoren wie FGF und den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF). Die aus den Typ A-Zellen stammenden Zytokine IL-1 β und TNF- α führen zu einer weiteren Aktivierung der FLS und zur weiteren Erhöhung der Produktion an GM-CSF, Proteasen und Entzündungsmediatoren. Andererseits exprimieren FLS auch lösliche TNF- α -Rezeptoren, die zu einer Neutralisation von TNF- α fähig sind (Alvaro-Gracia et al., 1993; Taylor, 1994) sowie den natürlichen IL-1-Rezeptorantagonisten (IL1-Ra), der zu einer Downregulation der synovialen Entzündungsreaktion beiträgt (Firestein et al., 1994). Es liegt somit nahe, dass ein kompliziertes Netzwerk auto- und parakriner Regulationsmechanismen die Funktion von Typ A- und Typ B-Synoviozyten gegenseitig beeinflussen (Firestein, 1996; Goddard et al., 1992). In diese Regulationsvorgänge sind auch Makrophagen einbezogen (Alvaro-Gracia et al., 1993). Im Falle der Rheumatoiden Arthritis führt dieses Zytokinnetzwerk zu einer selbstunterhaltenden Entzündungsreaktion.

Die Sekretion von MMPs durch fibroblastenähnliche Typ B-Synoviozyten wird maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor AP-1 reguliert (Trabandt et al., 1992). Das Vorhandensein von IL-1 β und TNF- α induziert die Genexpression und Produktion von MMPs (Dayer et al., 1985; MacNaul et al., 1990). TGF β und IFN- γ können die MMP-Produktion senken und dienen somit als natürliche Protektoren der Matrix (Overall et al., 1989; Unemori et al., 1991). Auch eine Anhebung des intrazellulären cAMP kann die Kollagenaseproduktion signifikant hemmen. Dies wurde in einer Studie für Prostaglandin E1 und Adenosinrezeptorantagonisten gezeigt.

Von zentraler Bedeutung für die Entwicklung der Entzündungsreaktion und der Gelenkschädigung bei der Rheumatoiden Arthritis ist das besonders von den Typ B-Synoviozyten produzierte IL-6 (Ishihara and Hirano, 2002). Verschiedene Faktoren führen zur Erhöhung der IL-6-Sekretion: TNF- α , IL-1 β und IL-17 (Chabaud et al., 1998; Nawata et al., 1989), TGF- β , sowie die Chemokine CCL2/monocyte chemotactic protein-1, CCL5/RANTES und CXCL12/stromal cell-derived factor (Nanki et al., 2001). Daher kommt der Inhibition dieses zentralen proinflammatorischen Zytokins große Bedeutung zu. Es wurde gezeigt, dass Prostaglandin E2 durch eine intrazelluläre Erhöhung von cAMP zu einer

Inhibition der IL-6-Produktion führt (Nawata et al., 1989).

In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss der intrazellulären cAMP-Erhöhung durch den Phosphodiesteraseinhibitor Rolipram auf die IL-6-Produktion stimulierter Synoviozyten untersucht werden. Hierzu verwendeten wir das Modell der antigeninduzierten Arthritis der Ratte, die Synoviozytenkultur entstammte arthritischen Rattenkniegelenken und die Stimulation erfolgte mit Lipopolysaccharid und Interferon- γ . Nach Stimulation war eine deutliche Erhöhung der IL-6-Produktion durch die Synoviozyten messbar. Es konnte eine dosisabhängige signifikante Reduktion der IL-6-Produktion unter Zugabe von Rolipram zur Zellkultur gezeigt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Zitnik et al. (1993), die eine Inhibition der IL-6-Sekretion humaner Fibroblasten nach Behandlung mit cAMP-steigernden Substanzen, Prostaglandin E1 und DBcAMP sowie Forskolin sahen. Demgegenüber wurde in mehreren Studien eine cAMP-abhängige Steigerung der IL-6-Level in humanen Gingiva-Fibroblasten beobachtet (Murakami et al., 2000; Okada et al., 1997). Tsuji et al. (1999) stellten eine Erhöhung der IL-6-Produktion einer mit IL-1 β stimulierten humanen Sarkomzelllinie durch Behandlung mit Rolipram dar .

In einem nächsten Ansatz sollte die Wirkung der intrazellulären cAMP-Steigerung durch Rolipram auf die TNF- α -Produktion der gleichen Synoviozytenkultur untersucht werden. Die nach Stimulation mit Lipopolysaccharid und Interferon- γ deutlich induzierte TNF- α -Produktion konnte durch die Zugabe von Rolipram zur Zellkultur fast vollständig inhibiert werden. Einen ähnlichen Effekt sahen Tsuji et al. (1999) im Fibroblastenmodell der IL-1 β -stimulierten humanen Sarkomzelllinie: durch den Phosphodiesteraseinhibitor Rolipram konnte die TNF- α -Produktion effektiv inhibiert werden. Die Wirkung einer cAMP-Erhöhung auf das Zytokinmuster scheint also stark von den untersuchten Zelllinien und den Stimulationsbedingungen abzuhängen.

Kultivierte synoviale Gewebsszellen stellen eine Mischung aus makrophagenähnlichen Typ A-Synoviozyten und fibroblastenartigen Typ B-Synoviozyten dar. Über viele Passagen sterben in Kultur die Typ A-Synoviozyten allmählich ab und es überwiegen die Typ B-Zellen. Der genaue Ursprung der in Kultur gewachsenen Zellen ist dabei nicht vollständig sicher, es ist auch vorstellbar, dass sie neben den fibroblastenartigen Synoviozyten ihren Ursprung im Bindegewebe unterhalb der synovialen Deckschicht oder anderen Hilfsstrukturen des Gelenkes haben. Allerdings haben Untersuchungen eine hohe Expression von VCAM-1 und Uridin-Diphosphoglucose-Dehydrogenase (UDPGD) in solchen Kulturen nachweisen können, die für fibroblastenartige Synoviozyten typisch sind und in den Zellen des Bindegewebes unterhalb der synovialen Deckschicht nicht zu finden sind (Firestein, 1996). Da es sich in der arthritischen Synovialis um ein sehr kompliziertes Zytokinnetzwerk mit

verschiedenen autokrinen und parakrinen Einflüssen handelt, ist das Verhältnis der kultivierten Zelltypen zueinander von großer Bedeutung.

In unserem Ansatz wurden Synoviozyten in der 3. Passage in Kultur genommen, man muss also davon ausgehen, dass es sich noch um eine Mischung aus makrophagenähnlichen Typ A-Synoviozyten und fibroblastenartigen Typ B-Synoviozyten handelte. Dafür spricht auch die Induzierbarkeit von IL-6 als typisches Zytokin der Typ B-Synoviozyten und TNF- α , das in das Zytokinspektrum der makrophagenähnlichen Typ A-Synoviozyten gehört.

Man kann allerdings davon ausgehen, dass die synovialen Fibroblasten bei weitem überwiegen. Trotzdem schafft eine solche Mischkultur aus makrophagenähnlichen Typ A-Synoviozyten, synovialen Fibroblasten (Typ B-Synoviozyten) und Bindegewebszellen unterhalb der synovialen Deckschicht ein komplexes Zytokinnetzwerk mit vielfältigen gegenseitigen Beeinflussungen. Dies könnte möglicherweise unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Beeinflussung der IL-6-Produktion durch Phosphodiesterase IV-Inhibitoren in einer Sarkomzelllinie als fibroblastärer Monozellkultur erklären.

Stickstoffmonoxid kann zum einen als Aktivierungsmarker für Synoviozyten gelten, zum anderen hat es vielfältige regulatorische Wirkungen auf das lokale Zytokinmuster im Synovium.

Durch Stimulation mit Lipopolysaccharid und Interferon- γ konnte eine deutliche Anregung der NO-Produktion in der Synoviozytenkultur erreicht werden. Die Zugabe von Rolipram in aufsteigender Konzentration zeigte zunächst eine dosisabhängige Hemmung der NO-Produktion.

Bei Behandlung mit höheren Konzentrationen des Phosphodiesteraseinhibitors wird der NO-supprimierende Effekt aber wieder nahezu vollständig aufgehoben.

6.4. Einfluss einer intrazellulären cAMP-Erhöhung durch Phosphodiesterase-Inhibitoren auf T-Zellen

In dieser Studie sollte der immunmodulatorische Effekt einer intrazellulären cAMP-Erhöhung durch Phosphodiesterase-Inhibitoren auf das T-Zell-System näher beleuchtet werden. Rolipram als selektiver Inhibitor des Phosphodiesterase-Isoenzymes IV diene in diesem Fall als Modellsubstanz, da das Isoenzym IV insbesondere in den Zellen des Immunsystems vorkommt und Rolipram bereits in anderen Studien eine immunmodulatorische Wirkung insbesondere auf die T-Lymphozyten und die Balance der T-Lymphozyten-Subsets zeigte (Navikas et al., 1998; Yamaki et al., 2004).

6.4.1. Beeinflussung der T-Zell-Proliferation

Um die Wirkung einer intrazellulären Erhöhung von cAMP durch Hemmung der Phosphodiesterase zu untersuchen, wurde ein Proliferationsassay gepoolter Milzzellen aus arthritischen Mäusen verwendet. Als Stimulantien dienten das T-Zell-Mitogen Concanavalin A (ConA) sowie als spezifisches Antigen methyliertes Rinderserumalbumin (mBSA). Es wurde die Aufnahme von [³H]-Thymidin in die Zellen nach 72 bzw. 120 Stunden Kultur gemessen.

In diesem Ansatz ließ sich eine deutliche Hemmung des Proliferationsverhaltens der Milzzellsuspension unter Zugabe des Phosphodiesteraseinhibitors Rolipram zeigen. Einen ähnlichen Effekt der cAMP-Erhöhung auf das Proliferationsvermögen von Lymphozyten beobachteten Ozegbe et al. für die Proliferation von separierten T-Zellen aus Lymphknoten- bzw. Milzzellpräparationen arthritischer Mäuse, die durch das spezifische Antigen Kollagen Typ II stimuliert wurden. In diesem Ansatz wurde allerdings Cholera-toxin als bekannter irreversibler Aktivator der Adenylatzyklase verwendet, um die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu steigern (Ozegbe et al., 2004). In einer anderen Studie konnte eine Hemmung des Proliferationsverhaltens von Milzzellen im Modell der Ovalbumin-induzierten Arthritis der Maus durch Zugabe von Rolipram beobachtet werden (Yamaki et al., 2004). Rolipram kann die Concanavalin A-stimulierte Proliferation von Rattenthymozyten zu etwa 60% hemmen, während nicht-selektive Phosphodiesterase-Inhibitoren wie Dipyridamol und Papaverin diese Proliferation nahezu vollständig unterdrücken (Marcoz et al., 1993). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Hemmung des Isoenzymes IV der Phosphodiesterase und die resultierende Anhebung des intrazellulären cAMP eine wichtige Regulatorfunktion auf das Proliferationsvermögen spezifisch und unspezifisch stimulierter T-Lymphozyten hat.

Werden naive T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor durch Bindung an einen Peptid-MHC-Komplex aktiviert, beginnen sie, Interleukin 2 zu sezernieren und prägen einen IL-2-Rezeptor aus. Eine Bindung des autokrin oder parakrin erzeugten IL-2 an diesen Rezeptor bewirkt eine Proliferation dieser spezifischen T-Zellen, die klonale Expansion. Das von T-Zellen exprimierte Interleukin 2 ist also essentiell für die Proliferation sowohl auto- als auch fremdantigenspezifischer T-Lymphozyten und kann daher als Marker für die T-Zell-Proliferation angesehen werden. Daher wurde die Beeinflussung der Interleukin 2-Produktion durch den spezifischen Phosphodiesterase-IV-Inhibitor Rolipram in einem weiteren Ansatz untersucht. Es ließ sich eine signifikante dosisabhängige Reduktion der IL-2-Produktion durch die Zugabe von Rolipram zu einer mitogenstimulierten T-Zell-Kultur nachweisen.

Souness et al. (1997) zeigten eine signifikante Hemmung der IL-2-Produktion von murinen Splenozyten, die mit dem Superantigen Staphylokokken-Enterotoxin A stimuliert wurden, durch verschiedene Phosphodiesterase-Inhibitoren. Dabei konnte eine Korrelation zwischen der Affinität der Phosphodiesterase-Inhibitoren zum Isoenzym IV und der Ausprägung des Einflusses auf IL-2 nachgewiesen werden.

Lewis et al. (1993) zeigten im Gegensatz dazu für die Jurkat-Zelllinie als Modell aktivierter Lymphozyten eine Proliferationshemmung durch Rolipram, aber keine Inhibition der IL-2-Produktion. Daraus wurde geschlussfolgert, dass der antiproliferative Effekt der Phosphodiesteraseinhibition nicht IL-2-vermittelt sei.

6.4.2. Einfluss auf die Th1/Th2-Balance

Rolipram zeigte eine dosisabhängige Hemmung der Produktion von IFN- γ , einem Th1-Zytokin, ebenso wie von IL-4, einem Th2-Zytokin. Die Untersuchung des Verhältnisses an IFN- γ zu IL-4 macht deutlich, dass hierbei durch den selektiven Phosphodiesteraseinhibitor Rolipram die Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ sehr viel effektiver gehemmt wird als die Konzentration des Th2-Zytokins IL-4, die nur eine geringe Reduktion erfährt.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Ozegbe et al. (2004) im Modell der kollageninduzierten Arthritis der Maus, die eine dosisabhängige Hemmung der IFN- γ -Level durch die Behandlung mit Rolipram beobachteten. In dieser Studie wurde außerdem eine geringfügige Anhebung der Produktion von IL-5 als Markerzytokin für die Th2-Zellsubpopulation durch Rolipram in sehr niedrigen Dosen gefunden. In höheren Dosen wurde die Zytokinproduktion durch Th2-Zellen gehemmt, wenngleich dieser Effekt sehr viel geringer ausfiel als für die Th1-Zellen. Ähnliche Ergebnisse konnten für die Behandlung der Ovalbumin-induzierten Arthritis der Maus gefunden werden: die Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ konnte in einer Studie von Yamaki et al. (2004) durch die Verabreichung von Rolipram deutlich supprimiert werden, während nur eine geringfügige Senkung der Konzentration an IL-10 als Marker für die Th2-Zell-Aktivität gesehen wurde. Ross et al. (1997) zeigten am Modell der Kollagen-induzierten Arthritis der Maus eine Erhöhung der Produktion an IL-10 durch kollagenstimulierte Lymphknotenzellen sowie eine signifikante Suppression von IFN- γ . Eine weitere Arbeitsgruppe konnte für Prostaglandin E₂, das ebenfalls ein potenter Stimulator des intrazellulären cAMP ist, eine signifikante Hemmung der Produktion von IFN- γ durch Th1-Zellen zeigen, während IL-4 unbeeinflusst blieb und die Konzentration an IL-5, beides Th2-Zytokine, sogar angehoben wurde (Betz and Fox, 1991). Demgegenüber zeigten Studien mit humanen peripheren Blutmonozyten (PBMC), dass

Rolipram die Proliferation von Th2-Zellen nach Stimulation mit einem Allergen (beifußblättrige Ambrosie bei Patienten, die eine klinisch manifeste Allergie gegenüber diesem Allergen aufwiesen) sehr viel effektiver hemmt als die Proliferation von Th1-Zellen nach Stimulation mit Tetanustoxoid. Der unselektive Phosphodiesteraseinhibitor 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) zeigte die gleiche proliferationshemmende Wirkung auf die PBMC nach Stimulation mit einem Th1- wie einem Th2-Stimulus (Essayan et al., 1994). In einem ähnlichen Ansatz zeigte van Wauwe et al. (1995), dass Rolipram die Produktion an IL-5 durch Phytohemagglutinin-stimulierte humane Blutzellen stärker hemmt als die Produktion von IFN- γ .

Als Hauptwirkungsmechanismus von Rolipram wird die intrazelluläre cAMP-Erhöhung durch die Hemmung der Phosphodiesterase angesehen, die zyklisches Adenosinmonophosphat in 5-Adenosinmonophosphat spaltet. Diese Anhebung des intrazellulären cAMP-Levels bedingt eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch Abspaltung der regulatorischen von der katalytischen Untereinheit. Der Proteinkinase A werden umfangreiche negative regulatorische Einflüsse auf verschiedene Komponenten der Signaltransduktionsmechanismen in T-Zellen zugeschrieben. So sind die Akkumulation des nukleären Faktors aktivierter T-Zellen (NF-AT) im Zellkern und die Aktivierung des nukleären Faktors kappa B (NF-kB) Wirkungsmechanismen einer PKA-Aktivierung (Sheridan et al., 2002; Torgersen et al., 2002). Außerdem erfolgt die Aktivierung einer Kaskade von mitogenaktivierten Proteinkinasen, des sogenannten MAP-Kinase-Pathways, der einen weiteren Transkriptionsfaktor, AP-1 aktiviert. Darüber hinaus kann die Proteinkinase A zur Aktivierung von Csk, einem negativen Regulator von Lck führen (Vang et al., 2001).

Lck ist eine Tyrosinkinase, die bei Aktivierung einer T-Zelle durch Bindung des T-Zell-Rezeptors und der entsprechenden Co-Rezeptoren an einen Peptid-MHC-Komplex über verschiedene Adaptermoleküle an der Aktivierung der Signaltransduktionskaskaden des Proteinkinase C-, Calcineurin- und MAP-Kinase-Systems beteiligt ist.

Durch diese Mechanismen hat die Aktivierung der Proteinkinase A umfangreiche Auswirkungen auf die Genexpression in der T-Zelle und damit ihre immunologische Funktion. Außerdem wurde über eine PKA-unabhängige negative Regulation der T-Zell-Aktivität durch eine intrazelluläre cAMP-Erhöhung berichtet (Staples et al., 2001), wenngleich die hierfür in Frage kommenden Mechanismen noch nicht ausreichend untersucht sind. Somit ergibt sich eine Reihe möglicher Erklärungen für die inhibitorischen Effekte von Phosphodiesterase-Inhibitoren auf T-Zellen, die jedoch die Frage offenlassen, warum die Th2-Subpopulation wesentlich weniger negativ beeinflusst wird als die Th1-Subpopulation. In unserem Ansatz wurde die intrazelluläre Konzentration an cAMP nicht gemessen. Es ist

jedoch bekannt, dass Phosphodiesterase-Inhibitoren zu einer intrazellulären cAMP-Erhöhung führen, die in einem ähnlichen Konzentrationsbereich liegt wie die durch Prostaglandin E (PGE₂) hervorgerufene (Betz and Fox, 1991). Eine Vorbehandlung mit PGE₂ führt jedoch gleichermaßen in Th1- wie in Th2-Zellen zu einer cAMP-Erhöhung. Aus diesem Grund kommt eine unterschiedliche Beeinflussung der cAMP-Level in Th1- und Th2-Zellen als ursächlich für die beobachtete stärkere Inhibition der Th1-Aktivität nicht in Frage.

In verschiedenen Arbeiten wurde eine Gruppe von Proteinen als wichtig für die Regulation der PKA-Aktivität erkannt, die als A-Kinase-Ankerproteine (AKAP) bezeichnet wird. Diese Proteine finden sich in verschiedenen Zelltypen, unter anderem in Lymphozyten (Felicciello et al., 2001; Michel and Scott, 2002; Schillace et al., 2002; Williams, 2002). Man kann also vermuten, dass sich die Expression der AKAP in Th1- und Th2-Zellen unterscheidet und dies eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Beeinflussung der beiden T-Zell-Subpopulationen durch Phosphodiesteraseinhibitoren sein könnte. Weiterhin könnte sich die Substratspezifität der Proteinkinase A in den T-Zell-Subpopulationen unterscheiden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen noch eine weitere interessante Beobachtung: niedrige Dosen des Phosphodiesterase-Inhibitors (0,00001 bis 0,001 μ Mol) führen zu einer geringfügigen Erhöhung der Konzentration sowohl an IL-4 als auch an IFN- γ . Dieser Effekt ist zwar nicht statistisch signifikant aber doch deutlich sichtbar und reproduzierbar. Ähnliche Beobachtungen konnten Ozegbe et al. (2004) für den Einfluss verschiedener, die intrazelluläre Konzentration an cAMP steigernder Substanzen (Prostaglandin E₂ und Rolipram) auf die Produktion des Th2-Zytokines IL-5 machen.

Diese Beobachtung führt zu der Frage, ob die hierfür notwendige Rolipramkonzentration eine Relevanz in vivo hat. Die Beantwortung dieser Frage ist nur schwer möglich, da die Konzentrationen der Therapiesubstanzen in vivo starken lokalen Schwankungen unterworfen sein dürften. Krause et al. (1990) fanden beispielsweise im Rahmen einer Toxizitätsstudie an gesunden Probanden Plasmamaximalkonzentrationen von 16ng/ml für eine orale Verabreichung. Daten für die erreichten Konzentrationen auf zellulärem Niveau liegen bisher nicht vor. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Konzentration, die bei einer Verabreichung in therapeutischer Absicht erreicht wird, deutlich höher als 0,001 μ Mol Rolipram liegen dürfte.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Phosphodiesterase-Inhibitoren einen direkten immunmodulatorischen Effekt auf die funktionelle Aktivität von T-Lymphozyten im Kontext der Antigen-induzierten Arthritis der Maus hat und eine deutlich stärkere Suppression auf die Th1-Zell-Subpopulation ausübt als auf die Th2-Zellen.

Für die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen scheinen Th1-vermittelte Effektorfunktionen, wie die Makrophagenaktivierung eine entscheidende Rolle zu spielen. Trotzdem mehren sich in jüngerer Zeit die Hinweise, dass das Modell der Verschiebung der Th1/Th2-Balance als entscheidendem Pathogenesemechanismus für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu stark vereinfacht ist. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Mäuse, die eine genetische Defizienz für IFN- γ ausweisen, suszeptibler für die Ausprägung einer Kollagen-induzierten Arthritis sind als normale Vergleichsstämme (Kelchtermans et al., 2005). Andererseits gibt es Studien, in denen das Fehlen von IL-4 den Verlauf einer experimentellen Arthritis nicht beeinflusst, ein Hinweis, der gegen die bisher angenommene protektive Wirkung von Th2-Zellen spricht (Hata et al., 2004).

Inzwischen wurde eine weitere Subpopulation von T-Zellen beschrieben, die offenbar entscheidenden Anteil in der Pathogenese entzündlicher Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis hat. Diese CD25-negativen T-Zellen produzieren grosse Mengen an Interleukin 17, dass Fibroblasten zur Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 stimulieren und die T-Zell-Proliferation anregen kann. Unter dem Einfluss von IL-17 werden Synoviozyten dazu angeregt, Granulozyten/Makrophagen-stimulierenden Faktor und Prostaglandin E₂ zu sezernieren (Fossiez et al., 1996; Lubberts et al., 2005). Th17-Zellen kommen in grosser Zahl im arthritischen Gelenk vor (Chabaud et al., 1999).

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass T-Zellen existieren, deren Hauptfunktion die Suppression anderer T-Lymphozyten darstellt. Diese, sogenannten regulatorischen T-Zellen können in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet adaptive regulatorische T-Zellen, die durch Antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen unter tolerogenen Bedingungen entstehen, von CD4+CD25+ natürlichen regulatorischen T-Zellen. Ihre Depletion oder funktionelle Inaktivierung führt zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen in Tiermodellen.

Frey et al. (2005) fanden eine signifikante Steigerung der klinischen Ausprägung der Antigen-induzierten Arthritis der Maus nach Depletion von CD4+CD25+ T-Zellen, die sich histologisch als vermehrte Hyperplasie und Infiltration der Synovialmembran sowie als stärkere Gelenkdestruktion darstellte. Dabei kam es zur gesteigerten Th1-Antwort (IFN- γ -Sekretion) ebenso wie zur Verstärkung der Th2-Antwort (IL-4-Sekretion). Umgekehrt konnte durch Transfer aktivierter CD4+CD25+ T-Zellen in arthritische Tiere eine Reduktion der klinischen Ausprägung der Arthritis und der histologischen Schwere der Destruktion erreicht werden. Auch im Modell der Kollageninduzierten Arthritis der DBA/1-Maus konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Depletion von CD25+CD4+-T-Zellen eine signifikant stärkere Ausprägung der Arthritis bedingte als in nicht depletierten Tieren. Der adoptive Transfer von

CD25+CD4+ T-Zellen verminderte die Ausprägung der Arthritis in diesem Modell deutlich (Morgan et al., 2003). Ebenso wurde dargestellt, dass ein adoptiver Transfer von regulatorischen T-Zellen aus BALB/c-Mäusen in SKG-Mäuse im Modell der spontanen CD4-vermittelten chronischen autoimmunen Arthritis der SKG-Maus eine Ausprägung der Arthritis verhindern kann (Hata et al., 2004). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass regulatorische T-Zellen entscheidenden Einfluss auf die Immunreaktionen haben, die der Entwicklung der Rheumatoiden Arthritis zugrundeliegen.

Aufgrund ihres breiten Antigenspektrums, das dem naiver T-Zellen entspricht, sind regulatorische T-Zellen in der Lage, eine Vielzahl von Fremd- und Autoantigenen zu erkennen und durch die Sekretion von IL-10 und TGF- β regulatorisch auf die T-Zellantwort gegen Fremd- und Autoantigene einzuwirken (Sakaguchi, 2004). Der genaue Mechanismus der Immunregulation durch diese T-Zellen liegt jedoch noch im Dunkeln.

Eine interessante Frage wäre die Möglichkeit einer Beeinflussung dieser inflammatorischen und regulatorischen T-Zellen durch spezifische Phosphodiesterase-Inhibitoren.

6.5. Weiterentwicklung des Therapieprinzips der Phosphodiesteraseinhibition

6.5.1. Mögliche Kombinationstherapien des Phosphodiesteraseinhibitors Rolipram

Aus den Erkenntnissen über die Wirkungsweise des selektiven Phosphodiesterase IV-Inhibitors Rolipram können mögliche erfolgversprechende Kombinationsansätze mit anderen Medikamenten hergeleitet werden.

So konnte an humanen peripheren Blutmonozyten und Makrophagen eine starke Steigerung des intrazellulären cAMP durch das Vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) beobachtet werden. Daraus resultierte eine deutliche Verringerung der LPS-induzierten TNF- α -Produktion. Allerdings blieb die Konzentration an IL-10 weitgehend unbeeinflusst. Dies ist auf eine mangelnde Aktivierung des „cAMP response binding protein“ (CREB) durch VIP zurückzuführen, dass nur eine sehr kurzfristige Erhöhung von cAMP verursacht. Gleichzeitig erfolgt eine Aktivierung der Phosphodiesterase, so dass das intrazelluläre cAMP sehr instabil ist. Durch diesen Mechanismus zeigte sich eine Monotherapie mit VIP in diesem Modell deutlich weniger wirksam als der Einsatz des Phosphodiesteraseinhibitors Rolipram allein. Die beschriebenen Erkenntnisse legen eine therapeutische Kombination von VIP mit einem Phosphodiesterase-Inhibitor nahe. Foey et al. (2003) fanden für diese Kombination einen additiven Effekt auf die Senkung von TNF- α und Anhebung von IL-10 nach LPS-Stimulation humaner Blutmonozyten und Makrophagen. In Kombination waren beide Substanzen in der

Lage, eine ausgeprägte Aktivierung des CREB hervorzurufen.

Eine ähnliche synergistische Wirkungsweise hat eine Kombinationstherapie mit Prostaglandinen, die über G-Proteine die Adenylatzyklase aktivieren und auf diese Weise zu einer verstärkten cAMP-Bildung führen (Eigler et al., 2001). In verschiedenen Studien konnte ein synergistischer Effekt der Kombination von Phosphodiesterase-Inhibitoren mit Prostaglandin E₂ bzw. Prostazyklinanaloga auf die cAMP-Erhöhung sowie die Suppression von TNF- α gezeigt werden (Greten et al., 1996; Sinha et al., 1995).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist auch die Kombinationstherapie eines PhosphodiesteraseIV-Inhibitors mit einem depletierenden, monoklonalen anti-CD4-Antikörper erfolgversprechend. Es trat hierbei ein signifikant additiver Effekt bezüglich der klinischen Reduktion der Arthritisaktivität auf und es ließ sich ein deutlicher Trend bezüglich der Inhibition der T-Zell-Reaktivität in vivo, ausgedrückt durch die verringerte Induzierbarkeit einer Immunreaktion vom verzögerten Typ (DTH-Reaktion) nachweisen.

Ausgehend von der Annahme der Verschiebung der Th1/Th2-Balance hin zur Th2-Immunantwort wirkt ein zusätzliches „Coating“ der T-Zellen (Mason et al., 2002) mit einem anti-CD4-Antikörper nochmals inhibierend auf die Th1-vermittelte Immunreaktion, die dem Pathogeneseprozess der Rheumatoiden Arthritis zugrunde liegt.

6.5.2. Mögliche Strategien zur Einschränkung der Nebenwirkungen von Phosphodiesterase-Inhibitoren

In den letzten Jahren ist das Prinzip der Inhibition von Phosphodiesterasen als antiinflammatorisches Therapiekonzept stark in den Mittelpunkt des Interesses vieler Forschungsgruppen und pharmazeutischer Unternehmen gerückt, weil man erkannt hat, dass insbesondere das Phosphodiesterase-Isoenzym IV maßgeblich an der Entstehung und Regulation vieler chronisch-inflammatorischer Erkrankungen, wie zum Beispiel chronisch-obstruktiver Lungenerkrankungen, Asthma oder eben der Rheumatoiden Arthritis beteiligt ist. Phosphodiesterase-Inhibitoren haben ein hohes therapeutisches Potential in der Behandlung der verschiedenen Modelle der Rheumatoiden Arthritis (Laemont et al., 1999), der atopischen Dermatitis (Ferrer et al., 1999; Hanifin et al., 1996), der multiplen Sklerose (Folcik et al., 1999), der Colitis ulcerosa (Hartmann et al., 2000) und endotoxininduzierter akuter Lungenschädigung (Escofier et al., 1999).

Es hat sich jedoch auch gezeigt, dass selektive PhosphodiesteraseIV-Inhibitoren in therapeutischen Plasmakonzentrationen erhebliche Nebenwirkungen aufweisen. Dies sind vor allem Übelkeit und Erbrechen (Hebenstreit et al., 1989; Zeller et al., 1984). Außerdem traten

eine erhöhte Magensäureproduktion und verschiedene ZNS-Nebenwirkungen auf (Burnouf and Pruniaux, 2002). Rolipram war die Ausgangssubstanz für die Synthese weiterer Phosphodiesterase IV-Inhibitoren, die jedoch alle mehr oder weniger ähnliche Nebenwirkungsprofile aufwiesen (Burnouf and Pruniaux, 2002). Ziel dieser Entwicklungen ist es, selektive Phosphodiesterase IV-Inhibitoren zu entwickeln, die ein erheblich größeres therapeutisches Fenster aufweisen als Rolipram. Hierzu gibt es verschiedene Strategien:

- Seit einiger Zeit weiß man, dass Rolipram auf zwei Arten an das Phosphodiesterase-Isoenzym IV binden kann. Ursprünglich ging man davon aus, dass zu der Bindung an das katalytische Zentrum der Phosphodiesterase eine zweite Bindungsstelle existiert, an die Rolipram mit hoher oder niedriger Affinität binden kann. Daraus resultierte der Begriff der HARBS (high affinity Rolipram binding site) bzw. LARBS (low affinity Rolipram binding site) (Schneider et al., 1986). Neuere Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass es sich bei den beiden Bindungsvarianten um zwei verschiedene Konformere der Phosphodiesterase IV handeln könnte, die durch reversible Bindung eines Kofaktors (Mg^{2+}) an das Apoenzym entstehen. Folgerichtig spricht man inzwischen von HPDE4 (high affinity Rolipram binding PDE IV) oder HAR (high affinity for Rolipram) bzw. LPDE4 (low affinity Rolipram binding PDE IV) oder LAR (low affinity for Rolipram) (Barnette, 1999; Burnouf and Pruniaux, 2002; Jacobitz et al., 1996; Souness and Rao, 1997; Torphy, 1998). Das HPDE4-Konformer dominiert in den Zellen des ZNS, während in den Zellen des Immunsystems insbesondere LPDE4 vertreten ist (Barnette et al., 1995, 1996). Man versucht nun, Substanzen zu finden, die spezifischer an das LPDE4-Konformer der Phosphodiesterase IV binden, um somit die Nebenwirkungen zu reduzieren (Barnette et al., 1995; Burnouf and Pruniaux, 2002; Duplantier et al., 1996). Um dies zu erreichen, kann eine Benzylierung der Phosphodiesterase-Inhibitoren vorgenommen werden. So erreicht man mit dem benzylierten Analogon von Rolipram die gleiche Wirkung auf die Phosphodiesterase IV, die Substanz bindet jedoch 60 mal schwächer an das HPDE4-Konformer als Rolipram. Die emetogene Wirkung dieser Substanz lag 10mal niedriger als die von Rolipram (Burnouf and Pruniaux, 2002).
- Ein weiterer Ansatz zur Reduktion der Nebenwirkungen bei vergleichbarer antiinflammatorischer Wirkung besteht in der Spezifität gegenüber den Phosphodiesterase IV-Subtypen. Das erste Medikament, das nach diesem Prinzip wirkt und bereits in ersten klinischen Studien erprobt wird, ist Ciclamilast. Diese Substanz hat eine 10mal schwächere Affinität zum Phosphodiesterase IV-D-Subtyp als zu den anderen Subtypen (Christensen et al., 1998).
- Erst seit kurzer Zeit besteht das Konzept der erst im Milieu entzündlicher Gewebe

aktivierten Medikamente, sogenannte DAD (disease activated drugs). Erstes Beispiel eines solchen Medikamentes ist ein Isoquinolin-Derivat in der experimentellen Asthmatherapie, das entweder als Prodrug oder in Kombination mit einem Steroid in den Organismus gebracht wurde. Die Umwandlung in die Wirkform erfolgte erst im entzündeten Milieu (Charpiot et al., 2001).

6.5.3. Derzeit in Entwicklung befindliche Phosphodiesterase-Inhibitoren

- Rolipram ist der älteste Vertreter dieser Substanzklasse und Ausgangssubstanz für weitere Entwicklungen. Es hat eine große Zahl von gastrointestinalen, kardiovaskulären und ZNS-Nebenwirkungen.
- Cilomilast wird derzeit für die Therapie von Asthma und chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen erprobt. In ersten Studien bewies es eine gute Wirksamkeit in der Unterdrückung von Husten- und Asthmaanfällen sowie thorakalen Engegefühl bei diesen Erkrankungen. Es kam zu einer deutlichen Verbesserung der Lungenfunktionsparameter. Demgegenüber standen Kopfschmerzen, abdominale Beschwerden, Diarrhoe und Übelkeit als Nebenwirkungen, die jedoch geringer ausgeprägt sind als bei Rolipram (Compton et al., 2001).
- Roflumilast, ein weiterer Phosphodiesterase IV-Inhibitor, wird derzeit in Studien für die Verwendung bei Asthma und chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen erprobt. Es hat sich gezeigt, dass diese Substanz sowohl die asthmatische Reaktion auf bronchiale Allergene als auch die Ausprägung von induzierten Bronchospasmen reduzieren kann, außerdem ist eine Wirksamkeit für die Behandlung der allergischen Rhinitis beschrieben.
- Piclamilast (RP73401) wurde zunächst als inhalatives Medikament in der Asthmatherapie entwickelt. Außerdem wurde eine Senkung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α , eine Erhöhung der IL-10-Konzentration sowie eine Hemmung der T-Zell-Antwort bei Verwendung im Modell der Rheumatoiden Arthritis beschrieben. Es zeigte sich jedoch, dass die Pharmakokinetik des Medikamentes unzureichend und die Nebenwirkungsrate relativ hoch ist (Burnouf and Pruniaux, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte die ursprünglich erwartete signifikant höhere Wirksamkeit, verglichen mit Rolipram ebenfalls nicht bewiesen werden.
- Cipamfylline ist ein selektiver Phosphodiesterase IV-Inhibitor, der in der Therapie der atopischen Dermatitis erprobt wird. Allerdings sind auch für diese Substanz Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen als Nebenwirkungsprofil beschrieben (Burnouf and Pruniaux, 2002).

7. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell der antigeninduzierten Arthritis der Maus die Wirkung einer Therapie mit selektiven PDE IV-Inhibitoren auf die Gelenkentzündung sowie die zugrundeliegenden Immunreaktionen untersucht.

Unter intraperitonealer Gabe des selektiven PDE IV-Inhibitors Rolipram in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht konnte eine deutliche Reduktion der Knieschwellung als klinischer Parameter der Gelenkentzündung sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase der Arthritis beobachtet werden. Dabei kann die Applikation ab dem Zeitpunkt der Arthritisinduktion als therapeutischer Ansatz angesehen werden. Der präventive Einsatz von Rolipram, beginnend 14 Tage vor Arthritisinduktion, kann das Maximum der Knieschwellung in der akuten Phase nochmals signifikant gegenüber dem therapeutischen Ansatz reduzieren. Hieraus kann man eine therapeutische Option selektiver PDE-Inhibitoren auch als Intervallmedikation zur Verzögerung bzw. Reduktion der Schwere einer erneuten Exazerbation der Erkrankung ableiten.

Mit dem selektiveren PDE IV-Inhibitor Piclamilast wird bereits in einer Konzentration von 2,5mg/kg Körpergewicht eine klinische Reduktion der Schwere der Arthritis erreicht, die jedoch hinter der Wirkung einer Therapie mit 10mg Rolipram/kg Körpergewicht zurückbleibt. Dies könnte auf die bereits von anderen Autoren beschriebene schlechtere Pharmakokinetik von Piclamilast zurückzuführen sein.

Sowohl die Therapie mit Rolipram in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht als auch mit dem anti-CD4-Antikörper GK1.5 und mit Piclamilast führte zu einer signifikanten Verringerung der mittels DTH-Reaktion gemessenen T-Zell-Reaktivität in vivo.

Histologisch war 21 Tage nach Arthritisauslösung, also in der chronischen Phase der Erkrankung, eine signifikante Reduktion der Entzündung und Gelenkdestruktion durch die Therapie mit dem PDE IV-Inhibitor Rolipram nachweisbar. Hierfür war jedoch die eingesetzte Konzentration und der Therapiebeginn vor oder zum Zeitpunkt der Arthritisauslösung unerheblich.

Durch die zusätzliche Therapie mit dem monoklonalen anti-CD4-Antikörper GK1.5 lässt sich ein additiver Effekt der klinischen Wirkung der beiden Therapiesubstanzen erzielen, bezüglich der T-Zell-Reaktivität in vivo (DTH-Reaktion) und der histologischen Veränderungen zeigte sich diese Kombinationstherapie aber nicht signifikant besser als die Behandlung mit den Einzelsubstanzen.

Die der Rheumatoiden Arthritis zugrundeliegende Immunreaktion wird maßgeblich durch die Aktivität von Makrophagen, T-Lymphozyten und den Synoviozyten der Gelenkinnenhaut bestimmt. Unter Therapie mit Rolipram kann eine deutliche Senkung der Produktion des proinflammatorischen TNF- α durch Makrophagen sowie eine Steigerung der Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 beobachtet werden. Die Konzentration von IL-6 wird durch den PDE-Inhibitor nur in höheren Konzentrationen gehemmt. Durch Zugabe von Rolipram in ansteigender Konzentration lässt sich eine zunehmende Hemmung der Proliferation von T-Zellen in vitro nachweisen. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die gezeigte deutliche Hemmung des IL-2 als Indikatorzytokin naiver T-Helfer-Lymphozyten. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Behandlung mit PDE-Inhibitoren einen direkten immunmodulatorischen Effekt auf die funktionelle Aktivität von T-Lymphozyten im Kontext der AIA der Maus hat und eine deutlich stärkere Suppression auf die Th1-Zellsubpopulation ausübt als auf die Th2-Zellsubpopulation. Synoviozyten spielen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis insbesondere als Quelle verschiedener Entzündungsmediatoren und matrixdegradierender Proteinasen eine Rolle. In der Kultur synovialer Fibroblasten wurde eine signifikante Hemmung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α unter Therapie mit Rolipram nachgewiesen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Einsatz selektiver Inhibitoren der PDE IV zu einer signifikanten Reduktion der klinisch und histologisch nachweisbaren Entzündungsreaktion und Destruktion sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase der AIA der Maus als Modell der Rheumatoiden Arthritis des Menschen führt. Auf zellulärer Ebene wirkt der Einsatz der PDE-Inhibitoren proliferationshemmend und immunmodulierend auf T-Lymphozyten und bedingt eine Verschiebung hin zur Th2-Reaktion. Es tritt eine Inhibition der Aktivierung von Makrophagen und Synoviozyten im Rahmen der Entzündungsreaktion ein. Dabei greifen Phosphodiesterase IV-Inhibitoren kausal im Pathogenesemechanismus der Arthritis an.

Der therapeutische Einsatz von PDE IV-Inhibitoren in der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis des Menschen erscheint daher zum jetzigen Zeitpunkt erfolgversprechend. Dabei kann eine Kombinationstherapie mit anderen Wirkmechanismen, wie beispielsweise dem Einsatz monoklonaler anti-CD4-Antikörper, zu einem additiven Effekt in der antiinflammatorischen Wirkung führen.

8. Literaturverzeichnis

1. Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, et al. 1998. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med*, 187(4), 461-68.
2. Alvaro-Gracia JM, Yu C, Zvaifler NJ, Firestein GS. 1993. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on fibroblast-like synoviocytes: paradoxical induction of IFN-gamma and TNF-alpha receptor expression. *J Clin Immunol*, 13(3), 212-18.
3. Appel H, Neure L, Kuhne M, Braun J, Rudwaleit M, Sieper J. 2004. An elevated level of IL-10- and TGFbeta-secreting T cells, B cells and macrophages in the synovial membrane of patients with reactive arthritis compared to rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, 23(5), 435-40.
4. Arend WP. 2001. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 45(1), 101-06.
5. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*, 190(7), 995-1004.
6. Atienza JM, Susanto D, Huang C, McCarty AS, Colicelli J. 1999. Identification of inhibitor specificity determinants in a mammalian phosphodiesterase. *J Biol Chem*, 274(8), 4839-47.
7. Barnette MS, Grous M, Cieslinski LB, Burman M, Christensen SB, Torphy TJ. 1995. Inhibitors of phosphodiesterase IV (PDE IV) increase acid secretion in rabbit isolated gastric glands: correlation between function and interaction with a high-affinity rolipram binding site. *J Pharmacol Exp Ther*, 273(3), 1396-402.
8. Barnette MS, Bartus JO, Burman M, Christensen SB, Cieslinski LB, Esser KM, et al. 1996. Association of the anti-inflammatory activity of phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitors with either inhibition of PDE4 catalytic activity or competition for [³H]rolipram binding. *Biochem Pharmacol*, 51(7), 949-56.
9. Barnette MS, Christensen SB, Essayan DM, Grous M, Prabhakar U, Rush JA, et al. 1998. SB 207499 (Ariflo), a potent and selective second-generation phosphodiesterase 4 inhibitor: in vitro anti-inflammatory actions. *J Pharmacol Exp Ther*, 284(1), 420-26.
10. Barnette MS. 1999. Phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Prog Drug Res*, 53, 193-229.
11. Beavo JA, Reifsnyder DH. 1990. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*, 11(4), 150-55.
12. Beavo JA. 1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*, 75(4), 725-48.
13. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. 1995. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*, 372(1), 83-87.
14. Beshay E, Croze F, Prud'homme GJ. 2001. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production in vitro and in vivo. *Clin Immunol*, 98(2), 272-79.
15. Betz M, Fox BS. 1991. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol*, 146(1), 108-13.
16. Bhardwaj N, Lau LL, Rivelis M, Steinman RM. 1988. Interleukin-1 production by mononuclear cells from rheumatoid synovial effusions. *Cell Immunol*, 114(2), 405-23.

17. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. 2006. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA*, 295(19), 2275-85.
18. Boots AM, Wimmers-Bertens AJ, Rijnders AW. 1994. Antigen-presenting capacity of rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunology*, 82(2), 268-74.
19. Borghaei RC, Rawlings PL, Jr., Mochan E. 1998. Interleukin-4 suppression of interleukin-1-induced transcription of collagenase (MMP-1) and stromelysin 1 (MMP-3) in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 41(8), 1398-406.
20. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. 1977a. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*, 20(3), 841-50.
21. Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR. 1977b. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J Immunol*, 118(5), 1645-48.
22. Branch DR, Shah A, Guilbert LJ. 1991. A specific and reliable bioassay for the detection of femtomolar levels of human and murine tumor necrosis factors. *J Immunol Methods*, 143(2), 251-61.
23. Brauer R, Kette H, Henzgen S, Thoss K. 1994. Influence of cyclosporin A on cytokine levels in synovial fluid and serum of rats with antigen-induced arthritis. *Agents Actions*, 41(1-2), 96-98.
24. Bundschuh DS, Eltze M, Barsig J, Wollin L, Hatzelmann A, Beume R. 2001. In vivo efficacy in airway disease models of roflumilast, a novel orally active PDE4 inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*, 297(1), 280-90.
25. Burkhardt H, Kalden JR. 1997. Animal models of autoimmune diseases. *Rheumatol Int*, 17(3), 91-99.
26. Burmester GR, Stuhlmüller B, Keyszer G, Kinne RW. 1997. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum*, 40(1), 5-18.
27. Burnouf C, Pruniaux MP. 2002. Recent advances in PDE4 inhibitors as immunoregulators and anti-inflammatory drugs. *Curr Pharm Des*, 8(14), 1255-96.
28. Butcher RW, Sutherland EW. 1962. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem*, 237, 1244-50.
29. Cao D, Borjesson O, Larsson P, Rudin A, Gunnarsson I, Klareskog L, et al. 2006. FOXP3 identifies regulatory CD25^{bright} CD4⁺ T cells in rheumatic joints. *Scand J Immunol*, 63(6), 444-52.
30. Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P. 1998. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol*, 161(1), 409-14.
31. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. 1999. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*, 42(5), 963-70.
32. Charles P, Elliott MJ, Davis D, Potter A, Kalden JR, Antoni C, et al. 1999. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF- α therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 163(3), 1521-28.
33. Charpiot B, Bitsch F, Buchheit KH, Channez P, Mazzoni L, Mueller T, et al. 2001. Disease activated drugs: a new concept for the treatment of asthma. *Bioorg Med Chem*, 9(7), 1793-805.
34. Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, et al. 2006. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*, 116(5), 1317-26.
35. Chizzolini C, Chicheportiche R, Burger D, Dayer JM. 1997. Human Th1 cells preferentially induce interleukin (IL)-1 β while Th2 cells induce IL-1 receptor

- antagonist production upon cell/cell contact with monocytes. *Eur J Immunol*, 27(1), 171-77.
36. Cho JY, Park JS, Baik KU, Lee JG, Kim HP, Yoo ES, et al. 2004. Differential effect of phosphodiesterase IV inhibitor RP73401 on various inflammatory and immune responses relevant to rheumatoid arthritis. *Pharmacol Res*, 49(5), 423-31.
 37. Choy EH, Kingsley GH, Panayi GS. 1998. Monoclonal antibody therapy in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*, 37(5), 484-90.
 38. Choy EH, Pitzalis C, Cauli A, Bijl JA, Schantz A, Woody J, et al. 1996. Percentage of anti-CD4 monoclonal antibody-coated lymphocytes in the rheumatoid joint is associated with clinical improvement. Implications for the development of immunotherapeutic dosing regimens. *Arthritis Rheum*, 39(1), 52-56.
 39. Choy EH, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, et al. 2002. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum*, 46(12), 3143-50.
 40. Christensen SB, Guider A, Forster CJ, Gleason JG, Bender PE, Karpinski JM, et al. 1998. 1,4-Cyclohexanecarboxylates: potent and selective inhibitors of phosphodiesterase 4 for the treatment of asthma. *J Med Chem*, 41(6), 821-35.
 41. Compton CH, Gubb J, Nieman R, Edelson J, Amit O, Bakst A, et al. 2001. Cilomilast, a selective phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease: a randomised, dose-ranging study. *Lancet*, 358(9278), 265-70.
 42. Connell L, McInnes IB. 2006. New cytokine targets in inflammatory rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 20(5), 865-78.
 43. Cooke TD, Sumia M, Elliott S, Maeda M. 1983. Immune complex mediated destruction of cartilage in antigen-induced arthritis of rabbits. *J Rheumatol Suppl*, 11, 103-07.
 44. Cooke TD, Sumi M, Maeda M. 1985. Nicolas Andry Award, 1984. Deleterious interactions of immune complexes in cartilage of experimental immune arthritis. I. The erosion of pannus-free hyaline cartilage. *Clin Orthop*, 193, 235-45.
 45. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. 1980. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*, 283(5748), 666-68.
 46. Cromartie WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH. 1977. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med*, 146(6), 1585-602.
 47. Cush JJ, Tugwell P, Weinblatt M, Yocum D. 1999. US consensus guidelines for the use of cyclosporin A in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 26(5), 1176-86.
 48. Dass S, Vital EM, Emery P. 2006. Rituximab: novel B-cell depletion therapy for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Pharmacother*, 7(18), 2559-70.
 49. Davis CW. 1984. Assessment of selective inhibition of rat cerebral cortical calcium-independent and calcium-dependent phosphodiesterases in crude extracts using deoxycyclic AMP and potassium ions. *Biochim Biophys Acta*, 797(3), 354-62.
 50. Dayer JM, Beutler B, Cerami A. 1985. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med*, 162(6), 2163-68.
 51. Dayer JM, Burger D. 1999. Cytokines and direct cell contact in synovitis: relevance to therapeutic intervention. *Arthritis Res*, 1(1), 17-20.
 52. de Benedetti F, Massa M, Robbioni P, Ravelli A, Burgio GR, Martini A. 1991. Correlation of serum interleukin-6 levels with joint involvement and thrombocytosis in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 34(9), 1158-63.
 53. de Hoo AS, van De Loo FA, Arntz OJ, van Den Berg WB. 2000. Involvement of IL-6, apart from its role in immunity, in mediating a chronic response during experimental arthritis. *Am J Pathol*, 157(6), 2081-91.
 54. Del Prete G, Maggi E, Pizzolo G, Romagnani S. 1995. CD30, Th2 cytokines and HIV

- infection: a complex and fascinating link. *Immunol Today*, 16(2), 76-80.
55. Dolhain RJ, ter Haar NT, Hoefakker S, Tak PP, de Ley M, Claassen E, et al. 1996. Increased expression of interferon (IFN)-gamma together with IFN-gamma receptor in the rheumatoid synovial membrane compared with synovium of patients with osteoarthritis. *Br J Rheumatol*, 35(1), 24-32.
 56. Dumonde DC, Glynn LE. 1962. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol*, 43, 373-83.
 57. Duplantier AJ, Biggers MS, Chambers RJ, Cheng JB, Cooper K, Damon DB, et al. 1996. Biarylcarboxylic acids and -amides: inhibition of phosphodiesterase type IV versus [3H]rolipram binding activity and their relationship to emetic behavior in the ferret. *J Med Chem*, 39(1), 120-25.
 58. Dyke HJ, Montana JG. 2002. Update on the therapeutic potential of PDE4 inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*, 11(1), 1-13.
 59. Eder M, Gedigk P, Hrsg. 1990. *Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie*. 33. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
 60. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med*, 200(3), 277-85.
 61. Eigler A, Siegmund B, Emmerich U, Baumann KH, Hartmann G, Endres S. 1998. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. *J Leukoc Biol*, 63(1), 101-07.
 62. Eigler A, Loher F, Endres S. 2001. [Suppression of synthesis of tumor necrosis factor]. *Internist (Berl)*, 42(1), 28-34.
 63. Endres S, Fulle HJ, Sinha B, Stoll D, Dinarello CA, Gerzer R, et al. 1991. Cyclic nucleotides differentially regulate the synthesis of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear cells. *Immunology*, 72(1), 56-60.
 64. Escofier N, Boichot E, Germain N, Silva PM, Martins MA, Lagente V. 1999. Effects of interleukin-10 and modulators of cyclic AMP formation on endotoxin-induced inflammation in rat lung. *Fundam Clin Pharmacol*, 13(1), 96-101.
 65. Essayan DM, Huang SK, Udem BJ, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. 1994. Modulation of antigen- and mitogen-induced proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells by nonselective and isozyme selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *J Immunol*, 153(8), 3408-16.
 66. Essayan DM, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Huang SK. 1997. Differential regulation of human antigen-specific Th1 and Th2 lymphocyte responses by isozyme selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*, 282(1), 505-12.
 67. Farmer LM, Watt G, Glatt M, Blaettler A, Loutis N, Feige U. 1986. Delayed type hypersensitivity (DTH) to type II collagen (CII) in DBA-1 mice. *Clin Exp Immunol*, 65(2), 329-35.
 68. Fassbender HG. 1983. Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll Relat Res*, 3(2), 141-55.
 69. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, 14, 397-440.
 70. Feldmann M, Maini RN. 2001. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol*, 19, 163-96.
 71. Feliciello A, Gottesman ME, Avvedimento EV. 2001. The biological functions of A-kinase anchor proteins. *J Mol Biol*, 308(2), 99-114.
 72. Ferrer L, Alberola J, Queralt M, Brazis P, Rabanal R, Llenas J, et al. 1999. Clinical anti-inflammatory efficacy of arofyline, a new selective phosphodiesterase-4 inhibitor, in dogs with atopic dermatitis. *Vet Rec*, 145(7), 191-94.
 73. Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF, Jr., Beckmann MP, Park LS, et al. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev*

- Immunol, 8, 303-33.
74. Firestein GS, Zvaifler NJ. 1990. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum*, 33(6), 768-73.
 75. Firestein GS, Paine MM, Littman BH. 1991. Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. *Arthritis Rheum*, 34(9), 1094-105.
 76. Firestein GS, Boyle DL, Yu C, Paine MM, Whisenand TD, Zvaifler NJ, et al. 1994. Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 37(5), 644-52.
 77. Firestein GS. 1996. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum*, 39(11), 1781-90.
 78. Foey AD, Field S, Ahmed S, Jain A, Feldmann M, Brennan FM, et al. 2003. Impact of VIP and cAMP on the regulation of TNF-alpha and IL-10 production: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 5(6), R317-28.
 79. Folcik VA, Smith T, O'Bryant S, Kawczak JA, Zhu B, Sakurai H, et al. 1999. Treatment with BBB022A or rolipram stabilizes the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis: an additional mechanism for the therapeutic effect of type IV phosphodiesterase inhibitors. *J Neuroimmunol*, 97(1-2), 119-28.
 80. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*, 183(6), 2593-603.
 81. Francischi JN, Yokoro CM, Poole S, Tafuri WL, Cunha FQ, Teixeira MM. 2000. Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. *Eur J Pharmacol*, 399(2-3), 243-49.
 82. Frey O, Petrow PK, Gajda M, Siegmund K, Huehn J, Scheffold A, et al. 2005. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res Ther*, 7(2), R291-301.
 83. Gantner F, Kupferschmidt R, Schudt C, Wendel A, Hatzelmann A. 1997. In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumour necrosis factor-alpha release by PDE inhibitors. *Br J Pharmacol*, 121(2), 221-31.
 84. Gartlehner G, Hansen RA, Jonas BL, Thieda P, Lohr KN. 2006. The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. *J Rheumatol*, 33(12), 2398-408.
 85. Gatto B. 2006. Biologics targeted at TNF: design, production and challenges. *Reumatismo*, 58(2), 94-103.
 86. Gay S, Gay RE. 1989. Cellular basis and oncogene expression of rheumatoid joint destruction. *Rheumatol Int*, 9(3-5), 105-13.
 87. Gay S, Gay RE, Koopman WJ. 1993. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis*, 52 Suppl 1, S39-47.
 88. Geiler T, Kriegsmann J, Keyszer GM, Gay RE, Gay S. 1994. A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum*, 37(11), 1664-71.
 89. Gifford GE, Lohmann-Matthes ML. 1987. Gamma interferon priming of mouse and human macrophages for induction of tumor necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide. *J Natl Cancer Inst*, 78(1), 121-24.
 90. Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. 1987. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum*, 30(2), 201-12.
 91. Glaser T, Traber J. 1984. TVX 2706--a new phosphodiesterase inhibitor with antiinflammatory action. Biochemical characterization. *Agents Actions*, 15(3-4),

- 341-48.
92. Goddard DH, Grossman SL, Williams WV, Weiner DB, Gross JL, Eidsvoog K, et al. 1992. Regulation of synovial cell growth. Coexpression of transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor by cultured synovial cells. *Arthritis Rheum*, 35(11), 1296-303.
 93. Goudy KS, Burkhardt BR, Wasserfall C, Song S, Campbell-Thompson ML, Brusko T, et al. 2003. Systemic overexpression of IL-10 induces CD4+CD25+ cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion. *J Immunol*, 171(5), 2270-78.
 94. Greten TF, Eigler A, Sinha B, Moeller J, Endres S. 1995. The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram differentially regulates the proinflammatory mediators TNF-alpha and nitric oxide. *Int J Immunopharmacol*, 17(7), 605-10.
 95. Greten TF, Sinha B, Haslberger C, Eigler A, Endres S. 1996. Cicaprost and the type IV phosphodiesterase inhibitor, rolipram, synergize in suppression of tumor necrosis factor-alpha synthesis. *Eur J Pharmacol*, 299(1-3), 229-33.
 96. Griffiths RJ, Li SW, Mather ME. 1992. Characterisation of passively transferred antigen arthritis induced by methylated bovine serum albumin in the rat: effect of FK 506 on arthritis development. *Agents Actions*, 36(1-2), 146-51.
 97. Hamperl, H. 1954. *Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie*. Berlin: Springer.
 98. Han J, Thompson P, Beutler B. 1990. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J Exp Med*, 172(1), 391-94.
 99. Hang L, Theofilopoulos AN, Dixon FJ. 1982. A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/l mice. *J Exp Med*, 155(6), 1690-701.
 100. Hanifin JM, Chan SC, Cheng JB, Tofte SJ, Henderson WRJ, Kirby DS, et al. 1996. Type 4 phosphodiesterase inhibitors have clinical and in vitro anti-inflammatory effects in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 107(1), 51-56.
 101. Harris ED, Jr. 1990. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*, 322(18), 1277-89.
 102. Hartmann G, Bidlingmaier C, Siegmund B, Albrich S, Schulze J, Tschoep K, et al. 2000. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 292(1), 22-30.
 103. Hata H, Sakaguchi N, Yoshitomi H, Iwakura Y, Sekikawa K, Azuma Y, et al. 2004. Distinct contribution of IL-6, TNF-alpha, IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J Clin Invest*, 114(4), 582-88.
 104. Hebenstreit GF, Fellerer K, Fichte K, Fischer G, Geyer N, Meya U, et al. 1989. Rolipram in major depressive disorder: results of a double-blind comparative study with imipramine. *Pharmacopsychiatry*, 22(4), 156-60.
 105. Hein G, Bolwin R, Brauer R, Eidner T, Franke S, Oelzner P, et al. 1995. [Rheumatology update--1. Summary of clinically significant current knowledge and outlook perspective of relevant trends in etiopathogenetic research, diagnostic methods and therapeutic possibilities]. *Med Klin*, 90(4), 231-39.
 106. Henzgen S, Petrow PK, Thoss K, Brauer R. 1996. Degradation of articular cartilage during the progression of antigen-induced arthritis in mice. A scanning and transmission electron microscopic study. *Exp Toxicol Pathol*, 48(4), 255-63.
 107. Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, et al. 1988. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, 18(11), 1797-801.
 108. Hiraoka K, Sasaguri Y, Komiya S, Inoue A, Morimatsu M. 1992. Cell proliferation-related production of matrix metalloproteinases 1 (tissue collagenase) and 3 (stromelysin) by cultured human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem Int*, 27(6), 1083-91.

109. Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuxchaisnes CN, Van Snick J. 1988. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum*, 31(6), 784-88.
110. Hunneyball IM, Crossley MJ, Spowage M. 1986a. Pharmacological studies of antigen-induced arthritis in BALB/c mice. I. Characterization of the arthritis and the effects of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory agents. *Agents Actions*, 18(3-4), 384-93.
111. Hunneyball IM, Crossley MJ, Spowage M. 1986b. Pharmacological studies of antigen-induced arthritis in BALB/c mice. II. The effects of second-line antirheumatic drugs and cytotoxic agents on the histopathological changes. *Agents Actions*, 18(3-4), 394-400.
112. Ichimura M, Kase H. 1993. A new cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme expressed in the T-lymphocyte cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 193(3), 985-90.
113. Inman RD. 1991. Infectious etiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 17(4), 859-70.
114. Ishihara K, Hirano T. 2002. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(4-5), 357-68.
115. Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O, Toivanen P, Punnonen J. 1999. Synovial fluid T cells from patients with rheumatoid arthritis are refractory to the T helper type 2 differentiation-inducing effects of interleukin-4. *Immunology*, 96(3), 358-64.
116. Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. 2000. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol*, 63(1), 17-31.
117. Jacobitz S, McLaughlin MM, Livi GP, Burman M, Torphy TJ. 1996. Mapping the functional domains of human recombinant phosphodiesterase 4A: structural requirements for catalytic activity and rolipram binding. *Mol Pharmacol*, 50(4), 891-99.
118. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, et al. 2001. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol*, 19, 23-45.
119. Jin SL, Lan L, Zoudilova M, Conti M. 2005. Specific role of phosphodiesterase 4B in lipopolysaccharide-induced signaling in mouse macrophages. *J Immunol*, 175(3), 1523-31.
120. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, et al. 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*, 160(7), 3513-21.
121. Kambayashi T, Jacob CO, Zhou D, Mazurek N, Fong M, Strassmann G. 1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. *J Immunol*, 155(10), 4909-16.
122. Kamradt T, Schubert D. 2005. The role and clinical implications of G6PI in experimental models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7(1), 20-28.
123. Karlsson JA, Souness J, Webber S, Pollock K, Raeburn D. 1995. Anti-inflammatory effects of the novel phosphodiesterase IV inhibitor RP 73401. *Int Arch Allergy Immunol*, 107(1-3), 425-26.
124. Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. 1994. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*, 179(5), 1517-27.
125. Kelchtermans H, De Klerck B, Mitera T, Van Balen M, Bullens D, Billiau A, et al. 2005. Defective CD4+CD25+ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma. *Arthritis Res Ther*, 7(2), R402-15.
126. Keyszer GM, Heer AH, Kriegsmann J, Geiler T, Trabandt A, Keysser M, et al. 1995. Comparative analysis of cathepsin L, cathepsin D, and collagenase messenger RNA expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, by in situ hybridization. *Arthritis Rheum*, 38(7), 976-84.
127. Kinne RW, Palombo-Kinne E, Emmrich F. 1997. T-cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis villains or accomplices? *Biochim Biophys Acta*, 1360(2), 109-41.

128. Kiyoshima T, Kido MA, Nishimura Y, Himeno M, Tsukuba T, Tashiro H, et al. 1994. Immunocytochemical localization of cathepsin L in the synovial lining cells of the rat temporomandibular joint. *Arch Oral Biol*, 39(12), 1049-56.
129. Kleinau S, Erlandsson H, Holmdahl R, Klareskog L. 1991. Adjuvant oils induce arthritis in the DA rat. I. Characterization of the disease and evidence for an immunological involvement. *J Autoimmun*, 4(6), 871-80.
130. P K. 1950. The concept of collagen diseases. *Am J Pathol*, 26(4), 505-19.
131. Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, et al. 1999. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity*, 10(4), 451-61.
132. Krause W, Kuhne G, Sauerbrey N. 1990. Pharmacokinetics of (+)-rolipram and (-)-rolipram in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*, 38(1), 71-75.
133. Laemont KD, Schaefer CJ, Juneau PL, Schrier DJ. 1999. Effects of the phosphodiesterase inhibitor rolipram on streptococcal cell wall-induced arthritis in rats. *Int J Immunopharmacol*, 21(11), 711-25.
134. Lalli E, Sassone-Corsi P. 1994. Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J Biol Chem*, 269(26), 17359-62.
135. Lan RY, Ansari AA, Lian ZX, Gershwin ME. 2005. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 4(6), 351-63.
136. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 201(2), 233-40.
137. Lewis GM, Caccese RG, Heaslip RJ, Bansbach CC. 1993. Effects of rolipram and CI-930 on IL-2 mRNA transcription in human Jurkat cells. *Agents Actions*, 39 Spec No, C89-92.
138. Linck G, Porte A. 1981. B-cells of the synovial membrane. IV. Ultrastructural evidence of secretory variations in hypophysectomized or propylthiouracyl-treated mice. *Cell Tissue Res*, 218(1), 123-28.
139. Lingnau K, Hoehn P, Kerdine S, Koelsch S, Neudoerfl C, Palm N, et al. 1998. IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12. *J Immunol*, 161(9), 4709-18.
140. Loewi G. 1968. Experimental immune inflammation in the synovial membrane. I. The immunological mechanism. *Immunology*, 15(3), 417-27.
141. Looney RJ, Hooper M, Pudiak D. 1995. Costimulatory activity of human synovial fibroblasts. *J Rheumatol*, 22(10), 1820-24.
142. Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. 2005. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther*, 7(1), 29-37.
143. MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. 1990. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *J Biol Chem*, 265(28), 17238-45.
144. Manganiello VC, Murata T, Taira M, Belfrage P, Degerman E. 1995. Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. *Arch Biochem Biophys*, 322(1), 1-13.
145. Manning CD, Burman M, Christensen SB, Cieslinski LB, Essayan DM, Grous M, et al. 1999. Suppression of human inflammatory cell function by subtype-selective PDE4 inhibitors correlates with inhibition of PDE4A and PDE4B. *Br J Pharmacol*, 128(7), 1393-98.
146. Marcoz P, Prigent AF, Lagarde M, Nemoz G. 1993. Modulation of rat thymocyte proliferative response through the inhibition of different cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms by means of selective inhibitors and cGMP-elevating agents. *Mol Pharmacol*, 44(5), 1027-35.
147. Mason U, Aldrich J, Breedveld F, Davis CB, Elliott M, Jackson M, et al. 2002. CD4

- coating, but not CD4 depletion, is a predictor of efficacy with primatized monoclonal anti-CD4 treatment of active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 29(2), 220-29.
148. Matsumoto I, Staub A, Benoist C, Mathis D. 1999. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science*, 286(5445), 1732-35.
 149. McCachren SS, Haynes BF, Niedel JE. 1990. Localization of collagenase mRNA in rheumatoid arthritis synovium by in situ hybridization histochemistry. *J Clin Immunol*, 10(1), 19-27.
 150. McCulloch J, Lydyard PM, Rook GA. 1993. Rheumatoid arthritis: how well do the theories fit the evidence? *Clin Exp Immunol*, 92(1), 1-6.
 151. McDonald JN, Levick JR. 1988. Morphology of surface synoviocytes in situ at normal and raised joint pressure, studied by scanning electron microscopy. *Ann Rheum Dis*, 47(3), 232-40.
 152. Menon JN, Bretscher PA. 1998. Parasite dose determines the Th1/Th2 nature of the response to *Leishmania major* independently of infection route and strain of host or parasite. *Eur J Immunol*, 28(12), 4020-28.
 153. Michel JJ, Scott JD. 2002. AKAP mediated signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 235-57.
 154. Mocci S, Coffman RL. 1997. The mechanism of in vitro T helper cell type 1 to T helper cell type 2 switching in highly polarized *Leishmania major*-specific T cell populations. *J Immunol*, 158(4), 1559-64.
 155. Molnar-Kimber K, Yonno L, Heaslip R, Weichman B. 1993. Modulation of TNF alpha and IL-1 beta from endotoxin-stimulated monocytes by selective PDE isozyme inhibitors. *Agents Actions*, 39 Spec No, C77-9.
 156. Moreland LW, Koopman WJ. 1991. Infection as a cause of arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 3(4), 639-49.
 157. Moreland LW, Heck LW, Jr., Koopman WJ. 1997. Biologic agents for treating rheumatoid arthritis. Concepts and progress. *Arthritis Rheum*, 40(3), 397-409.
 158. Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJ, et al. 2003. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 48(5), 1452-60.
 159. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136(7), 2348-57.
 160. Muller KM, Lisby S, Arrighi JF, Grau GE, Saurat JH, Hauser C. 1994. H-2D haplotype-linked expression and involvement of TNF-alpha in Th2 cell-mediated tissue inflammation. *J Immunol*, 153(1), 316-24.
 161. Murakami S, Terakura M, Kamatani T, Hashikawa T, Saho T, Shimabukuro Y, et al. 2000. Adenosine regulates the production of interleukin-6 by human gingival fibroblasts via cyclic AMP/protein kinase A pathway. *J Periodontal Res*, 35(2), 93-101.
 162. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. 2002. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res*, 4 Suppl 3, S233-42.
 163. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*, 171(11), 6173-77.
 164. Nanki T, Nagasaka K, Hayashida K, Saita Y, Miyasaka N. 2001. Chemokines regulate IL-6 and IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 167(9), 5381-85.
 165. Navikas V, Matusevicius D, Soderstrom M, Pirskanen R, Fredrikson S, Link H. 1998. The phosphodiesterase i.v. inhibitor rolipram in vitro reduces the numbers of MBP-reactive IFN-gamma and TNF-alpha mRNA expressing blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol*, 21(4), 236-44.
 166. Nawata Y, Eugui EM, Lee SW, Allison AC. 1989. IL-6 is the principal factor produced by synovia of patients with rheumatoid arthritis that induces B-lymphocytes to secrete immunoglobulins. *Ann N Y Acad Sci*, 557, 230-8, discussion 239.

167. Nicaise P, Gleizes A, Forestier F, Quero AM, Labarre C. 1993. Influence of intestinal bacterial flora on cytokine (IL-1, IL-6 and TNF-alpha) production by mouse peritoneal macrophages. *Eur Cytokine Netw*, 4(2), 133-38.
168. Nissler K, Pohlers D, Huckel M, Simon J, Brauer R, Kinne RW. 2004. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen induced arthritis: influence on macrophage activation. *Ann Rheum Dis*, 63(11), 1470-77.
169. Nozawa-Inoue K, Takagi R, Kobayashi T, Ohashi Y, Maeda T. 1998. Immunocytochemical demonstration of the synovial membrane in experimentally induced arthritis of the rat temporomandibular joint. *Arch Histol Cytol*, 61(5), 451-66.
170. Nyman U, Mussener A, Larsson E, Lorentzen J, Klareskog L. 1997. Amelioration of collagen II-induced arthritis in rats by the type IV phosphodiesterase inhibitor Rolipram. *Clin Exp Immunol*, 108(3), 415-19.
171. Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, et al. 1998. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(14), 8222-26.
172. Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, Okamatsu Y, Hanazawa S, Kitano S, et al. 1997. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J Periodontal Res*, 32(7), 559-69.
173. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. 1989. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 264(3), 1860-69.
174. Ozegbe P, Foey AD, Ahmed S, Williams RO. 2004. Impact of cAMP on the T-cell response to type II collagen. *Immunology*, 111(1), 35-40.
175. Palacios JM, Beleta J, Segarra V. 1995. Second messenger systems as targets for new therapeutic agents: focus on selective phosphodiesterase inhibitors. *Farmacol*, 50(12), 819-27.
176. Pasare C, Medzhitov R. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 299(5609), 1033-36.
177. Pearson CM. 1956. Rheumatoid arthritis. Recent findings and new pathogenic concepts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 92(3), 217-22.
178. Persson S, Mikulowska A, Narula S, O'Garra A, Holmdahl R. 1996. Interleukin-10 suppresses the development of collagen type II-induced arthritis and ameliorates sustained arthritis in rats. *Scand J Immunol*, 44(6), 607-14.
179. Petrow PK, Thoss K, Katenkamp D, Brauer R. 1996. Adoptive transfer of susceptibility to antigen-induced arthritis into severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Invest*, 25(4), 341-53.
180. Pober JS, Slowik MR, De Luca LG, Ritchie AJ. 1993. Elevated cyclic AMP inhibits endothelial cell synthesis and expression of TNF-induced endothelial leukocyte adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1, but not intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*, 150(11), 5114-23.
181. Pohlers D, Nissler K, Frey O, Simon J, Petrow PK, Kinne RW, et al. 2004. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clin Exp Immunol*, 135(3), 409-15.
182. Potter M, Wax JS. 1981. Genetics of susceptibility to pristane-induced plasmacytomas in BALB/cAn: reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristane-induced arthritis. *J Immunol*, 127(4), 1591-95.
183. Rohn TA, Jennings GT, Hernandez M, Grest P, Beck M, Zou Y, et al. 2006. Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur J Immunol*, 36(11), 2857-67.
184. Rontzsch A, Thoss K, Petrow PK, Henzgen S, Brauer R. 2004. Amelioration of murine antigen-induced arthritis by dehydroepiandrosterone (DHEA). *Inflamm Res*, 53(5), 189-98.

185. Ross SE, Williams RO, Mason LJ, Mauri C, Marinova-Mutafchieva L, Malfait AM, et al. 1997. Suppression of TNF-alpha expression, inhibition of Th1 activity, and amelioration of collagen-induced arthritis by rolipram. *J Immunol*, 159(12), 6253-59.
186. Rossol M, Hantzschel H, Wagner U. 2005. [T cell-dependent monocyte activation, TNFalpha and apolipoprotein A-I in autoimmunity and inflammation]. *Z Rheumatol*, 64(4), 249-54.
187. Sack U, Kuhn H, Ermann J, Kinne RW, Vogt S, Jungmichel D, et al. 1994. Synovial tissue implants from patients with rheumatoid arthritis cause cartilage destruction in knee joints of SCID.bg mice. *J Rheumatol*, 21(1), 10-16.
188. Sad S, Mosmann TR. 1994. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J Immunol*, 153(8), 3514-22.
189. Sakaguchi S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 22, 531-62.
190. Sano H, Forough R, Maier JA, Case JP, Jackson A, Engleka K, et al. 1990. Detection of high levels of heparin binding growth factor-1 (acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints. *J Cell Biol*, 110(4), 1417-26.
191. Sasai M, Saeki Y, Ohshima S, Nishioka K, Mima T, Tanaka T, et al. 1999. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arthritis Rheum*, 42(8), 1635-43.
192. Schettler G, Greten H, Hrsg. 1997. *Innere Medizin*, Bd.2. 9. Aufl. Thieme, Stuttgart.
193. Schillace RV, Andrews SF, Liberty GA, Davey MP, Carr DW. 2002. Identification and characterization of myeloid translocation gene 16b as a novel a kinase anchoring protein in T lymphocytes. *J Immunol*, 168(4), 1590-99.
194. Schneider HH, Schmichen R, Brezinski M, Seidler J. 1986. Stereospecific binding of the antidepressant rolipram to brain protein structures. *Eur J Pharmacol*, 127(1-2), 105-15.
195. Schubert D, Maier B, Morawietz L, Krenn V, Kamradt T. 2004. Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice. *J Immunol*, 172(7), 4503-09.
196. Schurigt U, Stopfel N, Huckel M, Pfirschke C, Wiederanders B, Brauer R. 2005. Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7(1), R174-88.
197. Sheridan CM, Heist EK, Beals CR, Crabtree GR, Gardner P. 2002. Protein kinase A negatively modulates the nuclear accumulation of NF-ATc1 by priming for subsequent phosphorylation by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*, 277(50), 48664-76.
198. Sheth SB, Chaganti K, Bastepe M, Ajuria J, Brennan K, Biradavolu R, et al. 1997. Cyclic AMP phosphodiesterases in human lymphocytes. *Br J Haematol*, 99(4), 784-89.
199. Shiozawa S, Shiozawa K, Fujita T. 1983. Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction. Light and electron microscopic studies of active cellular pannus. *Arthritis Rheum*, 26(4), 472-78.
200. Simon AK, Seipelt E, Sieper J. 1994. Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(18), 8562-66.
201. Simon J 2000. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von T-Helfer-Zellen bei der Antigen-induzierten Arthritis. [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität. Biologisch-Pharmazeutische Fakultät.
202. Simon J, Surber R, Kleinstaub G, Petrow PK, Henzgen S, Kinne RW, et al. 2001. Systemic macrophage activation in locally-induced experimental arthritis. *J Autoimmun*, 17(2), 127-36.
203. Sinha B, Semmler J, Eisenhut T, Eigler A, Endres S. 1995. Enhanced tumor necrosis factor suppression and cyclic adenosine monophosphate accumulation by combination of phosphodiesterase inhibitors and prostanoids. *Eur J Immunol*, 25(1), 147-53.
204. Soderling SH, Beavo JA. 2000. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol*, 12(2), 174-79.

205. Sommer F, Meixner M, Mannherz M, Ogilvie AL, Rollinghoff M, Lohoff M. 1998. Analysis of cytokine patterns produced by individual CD4⁺ lymph node cells during experimental murine leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *Int Immunol*, 10(12), 1853-61.
206. Souness JE, Griffin M, Maslen C, Ebsworth K, Scott LC, Pollock K, et al. 1996. Evidence that cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors suppress TNF alpha generation from human monocytes by interacting with a 'low-affinity' phosphodiesterase 4 conformer. *Br J Pharmacol*, 118(3), 649-58.
207. Souness JE, Houghton C, Sardar N, Withnall MT. 1997. Evidence that cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors suppress interleukin-2 release from murine splenocytes by interacting with a 'low-affinity' phosphodiesterase 4 conformer. *Br J Pharmacol*, 121(4), 743-50.
208. Souness JE, Rao S. 1997. Proposal for pharmacologically distinct conformers of PDE4 cyclic AMP phosphodiesterases. *Cell Signal*, 9(3-4), 227-36.
209. Staples KJ, Bergmann M, Tomita K, Houslay MD, McPhee I, Barnes PJ, et al. 2001. Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)-dependent inhibition of IL-5 from human T lymphocytes is not mediated by the cAMP-dependent protein kinase A. *J Immunol*, 167(4), 2074-80.
210. Starkebaum G, Shasteen NM, Fleming-Jones RM, Loughran TP, Jr., Mannik M. 1996. Sera of patients with rheumatoid arthritis contain antibodies to recombinant human T-lymphotrophic virus type I/II envelope glycoprotein p21. *Clin Immunol Immunopathol*, 79(2), 182-88.
211. Steinman L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*, 13(2), 139-45.
212. Hart BA, Kraakman E, Jonker M. 1994. An ear swelling reaction for in vivo monitoring of inflammatory T cell activity in collagen-arthritic rats. *J Immunol Methods*, 176(2), 179-84.
213. Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, et al. 2005. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Hum Immunol*, 66(3), 222-30.
214. Tada Y, Ho A, Koh DR, Mak TW. 1996. Collagen-induced arthritis in CD4⁻ or CD8⁻ deficient mice: CD8⁺ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. *J Immunol*, 156(11), 4520-26.
215. Taffet SM, Singhel KJ, Overholtzer JF, Shurtleff SA. 1989. Regulation of tumor necrosis factor expression in a macrophage-like cell line by lipopolysaccharide and cyclic AMP. *Cell Immunol*, 120(2), 291-300.
216. Tanaka A, O'Sullivan FX, Koopman WJ, Gay S. 1988. Etiopathogenesis of rheumatoid arthritis-like disease in MRL/l mice: II. Ultrastructural basis of joint destruction. *J Rheumatol*, 15(1), 10-16.
217. Tannenbaum CS, Hamilton TA. 1989. Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine peritoneal macrophages is selectively suppressed by agents that elevate intracellular cAMP. *J Immunol*, 142(4), 1274-80.
218. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, et al. 1994. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med*, 180(6), 2359-64.
219. Taylor DJ. 1994. Cytokine combinations increase p75 tumor necrosis factor receptor binding and stimulate receptor shedding in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 37(2), 232-35.
220. Taylor HG, Borg AA, Dawes PT. 1992. Human parvovirus B19 and rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, 11(4), 548-50.
221. Tomkins P, Cooper K, Webber D, Bowen G. 1992. The L929 cell bioassay for murine tumour necrosis factor is not influenced by other murine cytokines. *J Immunol Methods*, 151(1-2)(1-2), 313-15.

222. Torgersen KM, Vang T, Abrahamsen H, Yaqub S, Tasken K. 2002. Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. *Cell Signal*, 14(1), 1-9.
223. Torphy TJ. 1998. Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med*, 157(2), 351-70.
224. Trabandt A, Aicher WK, Gay RE, Sukhatme VP, Fassbender HG, Gay S. 1992. Spontaneous expression of immediately-early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatol Int*, 12(2), 53-59.
225. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. 1977. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*, 146(3), 857-68.
226. Tsuchiya N, Williams RC, Jr. 1992. Molecular mimicry--hypothesis or reality? *West J Med*, 157(2), 133-38.
227. Tsuji F, Oki K, Senda T, Horiuchi M, Mita S. 1999. Effects of mitogen-activated protein kinase inhibitors or phosphodiesterase inhibitors on interleukin-1-induced cytokines production in synovium-derived cells. *Immunol Lett*, 68(2-3), 275-79.
228. Unemori EN, Bair MJ, Bauer EA, Amento EP. 1991. Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts. Dissociable control of two metalloproteinases by interferon-gamma. *J Biol Chem*, 266(34), 23477-82.
229. Van bezooijen RL, Farih-Sips HC, Papapoulos SE, Lowik CW. 1999. Interleukin-17: A new bone acting cytokine in vitro. *J Bone Miner Res*, 14(9), 1513-21.
230. Van den Broek MF, Van de Langerijt LG, Van Bruggen MC, Billingham ME, Van den Berg WB. 1992. Treatment of rats with monoclonal anti-CD4 induces long-term resistance to streptococcal cell wall-induced arthritis. *Eur J Immunol*, 22(1), 57-61.
231. van Dinther-Janssen AC, Kraal G, van Soesbergen RM, Scheper RJ, Meijer CJ. 1994. Immunohistological and functional analysis of adhesion molecule expression in the rheumatoid synovial lining layer. Implications for synovial lining cell destruction. *J Rheumatol*, 21(11), 1998-2004.
232. van Roon JA, Bijlsma JW, Lafeber FP. 2006. Diversity of regulatory T cells to control arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 20(5), 897-913.
233. Van Wauwe J, Aerts F, Walter H, de Boer M. 1995. Cytokine production by phytohemagglutinin-stimulated human blood cells: effects of corticosteroids, T cell immunosuppressants and phosphodiesterase IV inhibitors. *Inflamm Res*, 44(9), 400-05.
234. Vang T, Torgersen KM, Sundvold V, Saxena M, Levy FO, Skalhegg BS, et al. 2001. Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor. *J Exp Med*, 193(4), 497-507.
235. Verghese MW, McConnell RT, Strickland AB, Gooding RC, Stimpson SA, Yarnall DP, et al. 1995. Differential regulation of human monocyte-derived TNF alpha and IL-1 beta by type IV cAMP-phosphodiesterase (cAMP-PDE) inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*, 272(3), 1313-20.
236. Voulgari PV, Drosos AA. 2006. Adalimumab for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther*, 6(12), 1349-60.
237. Wallace JL. 2005. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100 Suppl 1, 5-9.
238. Walmsley M, Katsikis PD, Abney E, Parry S, Williams RO, Maini RN, et al. 1996. Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 39(3), 495-503.
239. Wang P, Wu P, Ohlth KM, Egan RW, Billah MM. 1999. Phosphodiesterase 4B2 is the predominant phosphodiesterase species and undergoes differential regulation of gene expression in human monocytes and neutrophils. *Mol Pharmacol*, 56(1), 170-74.
240. Wilder RL, Crofford LJ. 1991. Do infectious agents cause rheumatoid arthritis? *Clin Orthop*, 265, 36-41.
241. Wilkinson LS, Edwards JC, Poston RN, Haskard DO. 1993. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in normal and inflamed synovium. *Lab Invest*, 68(1), 82-88.

- 242. Williams RO, Malfait AM, Butler DM, Walmsley MJ, Feldmann M, Maini RN. 1999. Combination therapy with DMARDs and biological agents in collagen-induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 17(6 Suppl 18), S115-20.
- 243. Williams RO. 2002. Cutting edge: A-kinase anchor proteins are involved in maintaining resting T cells in an inactive state. *J Immunol*, 168(11), 5392-96.
- 244. Wollenhaupt J, Zeidler H. 1993. [Early chronic polyarthritis. Possibilities and limits of inhibition of joint destruction]. *Internist (Berl)*, 34(4), 307-15.
- 245. Wraith DC. 2006. Anti-cytokine vaccines and the immunotherapy of autoimmune diseases. *Eur J Immunol*, 36(11), 2844-48.
- 246. Wutzler U. 1998. Therapieeffekte monoklonaler Antikörper gegen T-Zell-Subpopulationen auf die Antigen-induzierte Arthritis der Maus [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität. Medizinische Fakultät.
- 247. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. 2004. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*, 16(11), 1643-56.
- 248. Yamaki K, Li X, Uchida H, Alam AH, Hossain MA, Yanagisawa R, et al. 2004. Effects of the phosphodiesterase IV inhibitor rolipram on Th1 and Th2 immune responses in mice. *J Pharm Pharmacol*, 56(7), 877-82.
- 249. Yoshimura T, Kurita C, Nagao T, Usami E, Nakao T, Watanabe S, et al. 1997. Effects of cAMP-phosphodiesterase isozyme inhibitor on cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Gen Pharmacol*, 29(4), 633-38.
- 250. Zeller E, Stief HJ, Pflug B, Sastre-y-Hernandez M. 1984. Results of a phase II study of the antidepressant effect of rolipram. *Pharmacopsychiatry*, 17(6), 188-90.
- 251. Zitnik RJ, Zheng T, Elias JA. 1993. cAMP inhibition of interleukin-1-induced interleukin-6 production by human lung fibroblasts. *Am J Physiol*, 264(3 Pt 1), L253-60.

9. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rolf Bräuer für die Vergabe des Promotionsthemas, für die vielfältige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sowie bei der Erstellung der Dissertationsschrift.

Allen derzeitigen und ehemaligen Wissenschaftlern und MTAs der Arbeitsgruppe „Immunpathologie“ danke ich für ihre Unterstützung, für die kritische Diskussion der Daten sowie für die freundliche und aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei W. Kröber, C. Hüttich, H. Börner und U. Griechen für ihre exzellente technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente. Für Ihre Hilfe bei der Durchführung der Tierexperimente und ELISA-Tests möchte ich Frau Dr. Jutta Simon Dank sagen.

Frau Dr. Kirstin Mentzel danke ich für das in dieser Promotion verwendete Rattensynovialgewebe sowie die Mithilfe bei den Experimenten mit Fibroblastenkulturen.

Bei den Firmen E. Merck, Darmstadt bzw. Byk-Gulden, Konstanz möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten und in dieser Arbeit verwendeten Medikamente Rolipram bzw. Piclamilast bedanken.

Bei meinen Eltern Dr. Gottfried und Heide Wendler und bei meiner lieben Frau Eva-Maria Wendler möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung sowie ihre Geduld mit mir von ganzem Herzen bedanken.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Rolf Bräuer

Dr. Jutta Simon

Dr. Kirstin Mentzel

Dr. Klaus Thoß

- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, am 25.03.2007

Marcus Wendler, Verfasser

11. Lebenslauf

Marcus Wendler
Lange Brücke 59
99084 Erfurt

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 28.07.1975
Geburtsort: Rodewisch
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

Schul Ausbildung

09/81 - 08/90 Grundschole / Polytechnische Oberschole
09/90 – 06/93 Gymnasium
29.06.1993 Abitur

Zivildienst

07/93 – 09/94 Krankenpflegehelfer/Kreiskrankenhaus Rodewisch

Studium der Humanmedizin

10/94 – 09/96 Vorklinisches Studium / Friedrich-Schiller-Universität Jena
20.09.1996 Ärztliche Vorprüfung
10/96 – 04/00 Klinisches Studium / Friedrich-Schiller-Universität Jena
18.09.97 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.04.00 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/00-04/01 Praktisches Jahr / Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena
24.04.01 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Arzt im Praktikum

05/2001 – 12/2001 Arzt im Praktikum an der Klinik für Dermatologie und
dermatologische Allergologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

01/2002 – 11/2002 Arzt im Praktikum an der Hautklinik des HELIOS-Klinikum Erfurt

Arzt in Weiterbildung

seit 11/2002 Assistenzarzt an der Hautklinik des HELIOS-Klinikum Erfurt